

# ACTA

## PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

# 4.

## 2013

APHGAO 83, (043) 105–148. (2013)



A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság  
Elnöksége,  
a Társaság Titkársága  
és az ACTA Pharmaceutica Hungarica szerkesztői  
köszöntik kedves Olvasóinkat.



Boldog Új Esztendőt,  
valamint szakmai törekvéseik  
megvalósításához sok sikert kívánunk!

# ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

*Főszerkesztő:*

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.  
Tel.: 217-0891;  
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

*Felelős szerkesztő:*

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,  
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7–9.  
Tel.: 217-0927;  
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

*A szerkesztőbizottság tagjai:*

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,  
Tóthfalusi László

*A szerkesztőség címe – Correspondence:*

Acta Pharmaceutica Hungarica  
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

*A főszerkesztő munkatársa:*

Hankó Zoltán MGYT,  
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.  
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

---

## TARTALOM

<i>Laki Szilvia, Kalapos-Kovács Bernadett, Antal István, Klebovich Imre: Dohányzás-gyógyszer interakciók jelentősége a korszerű gyógyszerkutatásban. ....</i>	107
<i>Szokol Bálint, Gyulavári Pál, Baska Ferenc, Ibolya Kurkó, Greff Zoltán, Szántai Kis-Csaba, Zoltán Órfi, Peták István, Axel Ullrich, Vántus Tibor, Kéri György, Órfi László: EGFR/c-Met kettősgátlók fejlesztése és biokémiai vizsgálata. ....</i>	121
<i>Csobán Zsombor, Kállai Nikolett, Polgár Ádám, Antal István: Multipartikuláris gyógyszerhordozó rendszer formulálása tablettába préselt pelletek alkalmazásával ....</i>	134
<i>Hegymegi-Barakonyi Bálint, Órfi László, Kéri György, Kövesdi István: Kohonen-féle önszerveződő tulajdonságtérkép használata humán ADMET és kináz adatok QSAR predikciójában ....</i>	143

## CONTENTS

<i>Laki, Sz., Kalapos-Kovács, B., Antal, I., Klebovich, I.</i> : Importance of drug interactions with smoking in modern drug research .....	107
<i>Szokol B., Gyulavári P., Baska F., Greff Z., Szántai-Kis Cs., Őrfi Z., Peták I., Vántus T., Kéri G., Őrfi L.</i> : Development and biochemical characterization of EGFR/ c-Met dual inhibitors .....	121
<i>Csobán, Z., Kállai, N., Polgár, Á., Antal, I.</i> : Formulation of multiparticular drug delivery systems by compressing pellets into tablets .....	134
<i>Hegymegi-Barakonyi B., Őrfi L., Kéri G., Kövesdi I.</i> : Application of Kohonen Self Organized Feature Maps in QSAR of human ADMET and kinase data sets. ....	143

Acta Pharmaceutica Hungarica: [www.mgyt.hu](http://www.mgyt.hu)

---

„Acta Pharmaceutica Hungarica” a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata  
Kiadja a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16. Telefon: 235-09-99; E-mail: szerkesztoseg@mgyt.hu  
**Felelős kiadó: Prof. Dr. Szökő Éva**  
Előfizethető: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16., belföldi postautalványon vagy átutalással  
az MGYT átutalási számlájára: OTP VIII. kerületi fiók, Budapest, József krt. 33.  
MGYT elszámolási számla sz. 11708001–20530530  
Adószám: 19000754–2–42  
Előfizetési díj egész évre: 6000 Ft + 300 Ft áfa  
Megjelenik negyedévenként. Példányszám: 785 db  
Tördelőszerkesztő: *Oláh Csaba*  
Sokszorosítás: Print Invest Magyarország-H Zrt., 1053 Budapest, Papnövelde út 8. II. em. 26.  
Felelős vezető: Ványik László ügyvezető igazgató



## Dohányzás-gyógyszer interakciók jelentősége a korszerű gyógyszerkutatásban

LAKI SZILVIA<sup>1</sup>, KALAPOS-KOVÁCS BERNADETT<sup>2</sup>, ANTAL ISTVÁN<sup>2</sup>,  
KLEBOVICH IMRE<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Belvárosi Gyógyszertár, 7700 Mohács, Szabadság u. 26.

<sup>2</sup>Gyógyszerészeti Intézet, Semmelweis Egyetem, 1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7.

\*e-mail: klebovich.imre@pharma.semmelweis-univ.hu

### Summary

Laki, Sz., Kalapos-Kovács, B., Antal, I., Klebovich, I.: **Importance of drug interactions with smoking in modern drug research**

Drug interaction is a process during which a drug's fate in the body or its pharmacological properties are altered by an influencing factor. The extent of the drug interaction's effect can vary. The interaction could result from the modulation by another drug, food, alcohol, caffeine, narcotics, a drug influencing absorption or smoking. Moreover, transporter interactions with smoking could also have a major impact on many drug's efficacy.

Clinically relevant drug interactions with smoking were classified in terms of their effect: pharmacokinetic, pharmacodynamic and transporter interactions.

Polycyclic aromatic carbohydrates, found in cigarette smoke, have enzyme inducing properties. The interaction affects mainly the hepatic isoenzyme CYP1A2. Interactions caused by smoking have an effect on all drugs being substrates of and therefore metabolised by CYP1A2. Pharmacokinetic alteration can also occur during the absorption, distribution and elimination process. The pharmacodynamic interactions are mainly caused by the effects of nicotine, a cigarette smoke component. Through interactions, smoking could also modify the activity of transporter proteins, altering this way the ADME properties of many drugs.

Since smoking is one of the deadliest artefact in the history of human civilisation, identifying drug interactions with smoking is the physician's and pharmacist's major responsibility and task. Moreover, it is necessary to identify the patient's smoking habits during a medical treatment.

This review aims to investigate the main types of drug interactions (PK/PD), identify factors influencing the activity of CYP enzymes and transporters, and also summarize the mechanisms of the most important drug interactions with smoking and their clinically relevant consequences (Table II–VI.). Drugs, with effects somehow altered by smoking-interactions, have been studied.

**Keywords:** smoking, drug interactions, CYP enyzmes, pharmacokinetic and pharmacodynamic mechanisms, efflux ABC and uptake transporters, ADME

### Összefoglalás

Gyógyszeres interakcióknak nevezzük azokat a folyamatokat, amelyekben megváltozik egy farmakon szerkezetbeli sorsa, illetve farmakológiai hatásmódosulás történik valamely tényező hatására. Az interakciók következményeként kialakuló hatásváltozás súlyossága eltérő lehet. A kölcsönhatások létrejöhetnek egy másik gyógyszer, ételek, alkohol, koffein, kábítószer, felszívódást befolyásoló szerek, valamint dohányzás hatására egyaránt. A dohányzás transzporter kölcsönhatások révén is befolyásolhatja számos gyógyszer hatásmechanizmusát.

A klinikai jelentőségű gyógyszer-dohányzás interakciók csoportosítása a hatásmechanizmus típusa szerint történt: így megkülönböztetünk farmakokinetikai, farmakodinámiás és transzporter kölcsönhatásokat/interakciókat.

A legtöbb interakciós mechanizmus a dohányfüstben megtalálható policiklusos aromás szénhidrogének enziminduktor hatásainak közvetítésével zajlik. Az interakció főként a májbéli CYP1A2 izoenzimet érinti. A CYP1A2 szubsztrátjaiként metabolizálódó farmakonok kivétel nélkül érintettek a dohányzás okozta interakciós mechanizmusban. A farmakokinetikai változás ezen kívül bekövetkezhet az abszorpció, a disztribúció és az elimináció utak bármelyikén. A farmakodinámiás kölcsönhatások kialakulása leginkább a cigarettában található nikotin szervezetre gyakorolt hatásainak tudható be. A dohányzás befolyásolhatja a transzportfehérjék működését, így az interakció révén módosítva számos hatóanyag ADME tulajdonságát.

A dohányzás, mint civilizációs ártalom következtében a gyógyszer-dohányzás interakciók felismerése, azonosítása az orvosi és gyógyszerészeti gyakorlat fontos feladata. A beteg dohányzási szokásának felmérése bizonyos gyógyszeres kezelések során elengedhetetlen.

A jelen átfogó közlemény célja, hogy bemutassa a gyógyszeres interakciók főbb típusait (PK/PD) és ezeken belül a CYP enzimek és transzporterek aktivitását befolyásoló tényezőket, továbbá összefoglalja a legfontosabb gyógyszer-dohányzás interakciók mechanizmusait és a fellépő klinikai jelentőségű következményeket (II–VI. összefoglaló táblázat). Azon gyógyszerhatóanyagok kerültek felsorolásra, amelyeknek valamilyen úton-módon megváltozik a szervezetre gyakorolt hatása a dohányzás következtében.

**Kulcsszavak:** dohányzás, gyógyszer interakciók, CYP enzimek, farmakokinetikai és farmakodinámiás mechanizmusok, efflux ABC és uptake transzporterek, ADME

## Bevezetés

A *Nicotiana tabaccum* – a dohány – felhasználása hosszú időre nyúlik vissza. Egyes fejlődő országokban a mai napig divatos szokásnak tartják, míg az iparilag fejlett társadalmakban az 1960-as évek óta egyre gyűlt azon tudományos kutatások sora, amelyek a dohányzás súlyos egészségkárosító hatását bizonyítják. Statisztikai adatok szerint a világon mintegy 1,3 milliárd ember dohányzik. Hazánk sajnálatos módon a világgranglista élmezőnyében helyezkedik el. Magyarországon az egy főre eső cigarettafogyasztás évi 1623 szál/fő. A férfiak 45,7%-a, a nők 33,9%-a dohányzik hazánkban. Amennyiben a jelenlegi tendencia folytatódik, 2030-ra a dohányzás által bekövetkezett halálozás minden hatodik embert érinti majd. Világszerte a fiatalok körében nagyjából minden ötödik tinédzser dohányzik [1]. Az adatok egyértelműen tükrözik, hogy a dohányzás mind közegészségügyi, mind társadalmi szempontból lényeges problémát jelent.

A dohányzás egészségkárosító hatása régóta ismert. Jelentős rizikófaktor a kardiovaszkuláris betegségek, a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), valamint számos tumoros betegség kialakulásának. Az egészségkárosító tényezők leginkább a dohányfüstben fellelhető karcinogének, valamint egyéb égéstermékek – mint amilyen a szén-monoxid – hatásának tudhatók be. A dohányfüst lényegében két fázisra osztható. A gázfázisban képződnek például a szén-monoxid, a nitrogén-oxid, az ammónia, a szénhidrogének és az aldehidek. A másik fázisban – részecskefázis vagy diszperz közeg – található a dohányfüst összetevőinek főbb hányada. Ide sorolhatók többek között a *nikotin*, a policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok), a különböző oldószerek és a kátrány. A do-

hányfüstben mindeddig összesen 69 rákkeltő vegyületet azonosítottak, ezek közül 11 bizonyítottan, 7 vegyület pedig feltételezhetően humán karcinogén anyag. A dohányzás során a szervezetbe került *nikotin* jelentős hatással van a kardiovaszkuláris rendszer működésére. Hatását a *nikotinos* acetyl-kolin receptor közvetítésével fejti ki. Ezen a receptoron keresztül zajlik az autonóm ganglionáris folyamat, valamint a neuromuszkuláris junkció is. A szervekre gyakorolt hatásai egyaránt lehetnek aktiváló, valamint gátló típusúak. Az addiktív hatások kialakulásáért a *nikotin* által közvetített dopamin-felszabadulás felel. A függőséget a „jutalmazó központra” gyakorolt hatás okozza, amelyet számos jellegzetes tünet kísér: ingerlékenység, idegesség, a koncentrációkészség zavara, nyugtalanság, álmatlanság, csökkent szívfrekvencia, fokozott étvágy [2].

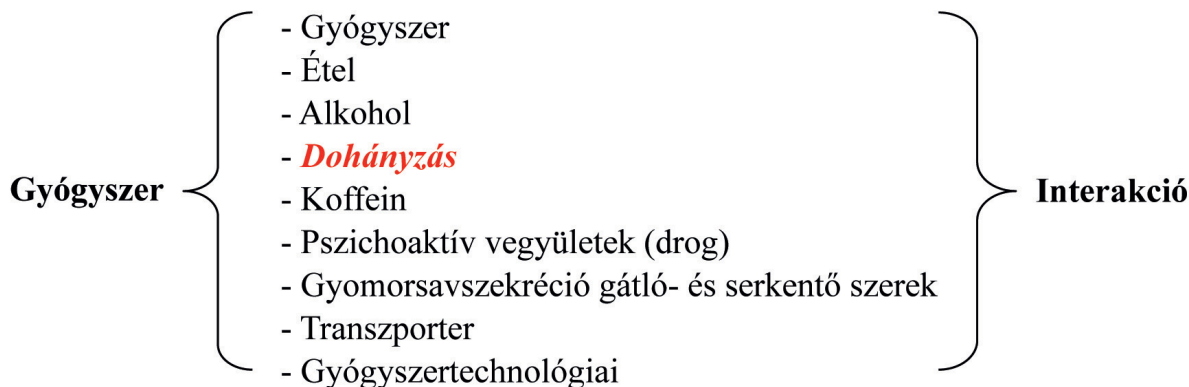
A farmakonok és a dohányzás között kialakuló kölcsönhatások a gyógyszerek farmakokinetikai tulajdonságait módosíthatják. Ezáltal megváltozhat a hatóanyag felszívódása, eloszlása, metabolizmus, valamint az elimináció sebessége (ADME). Ezek az interakciók főként a dohányfüst-expozíció következtében alakulnak ki.

A *nikotin* farmakodinámiás hatásainak következtében a farmakonok hatékonysága is módosulhat.

A gyógyszerek és a dohányzás között fellépő interakciók kutatása a biztonságos gyógyszeres terápia érdekében kiemelkedő jelentőséggel bír. Az interakciók felismerése, azok preklinikai és klinikai vizsgálata a napi gyógyszerészi gyakorlatban is fontos szerepet játszik.

## Elméleti háttér

Gyógyszerkölcsönhatásról beszélünk, amikor egy gyógyszer (hatóanyag) hatása megváltozik egy



1. ábra: A gyógyszerkutatásban vizsgálandó főbb interakciók típusai

másik gyógyszer (hatóanyag), étel, ital vagy valamilyen külső kémiai anyag jelenlétében (**1. ábra**) [3]. Egy amerikai felmérés szerint a kórházi beutalások mintegy 3%-a a gyógyszerkölsönhatások következtében történik [4].

A kölcsönhatások kialakulása számos tényezőtől függ. Az egyéni érzékenység mellett például az életkor, a genetikai tényezők, a betegségek, az elfogyasztott étel, a szorongóterekre gyakorolt hatások, a polifarmácia, valamint a különböző környezeti tényezők – így a dohányzás is – egyaránt befolyásolhatják az interakciók kialakulását. A sikeres gyógyszeres terápia elengedhetetlen része a lehetséges interakciók ismerete annak érdekében, hogy az esetleges nem kívánt hatások elkerülhetők legyenek. Az interakciók következményeként megjelenő hatásváltozás mértéke, súlyossága rendkívül eltérő lehet. Káros következményként a kívánt hatás nő vagy csökken, a nem kívánt hatás fokozódhat, illetve új, nem várt hatás alakulhat ki.

A gyógyszerek és a dohányzás közötti interakciók farmakokinetikai (PK) és farmakodinámiás (PD) mechanizmusok révén egyaránt létrejöhetnek. A dohányzás következtében előforduló farmakokinetikai változások létrejöhetnek a felszívódás, a disztribúció, a metabolizmus és az exkréció folyamatainak befolyásolása révén. A legfontosabb interakciók a metabolikus átalakulás során történnek. A farmakodinámiás interakciók főként receptorális szinten kialakuló kölcsönhatások, amelyek leginkább a *nikotin* hatásának tudhatók be [5]. A továbbiakban a lehetséges interakciós mechanizmusokat a fent említett csoportosítás szerint mutatjuk be, kiegészítve a legújabb szorongóter kölcsönhatások eredményeivel.

### Farmakokinetikai interakciók

#### *Abszorpció során bekövetkező farmakokinetikai interakciók*

Az I-es típusú inzulindependens diabetes mellitus során alkalmazott *inzulin* farmakokinetikai interakciója dohányzással az abszorpció során megy végbe. Feltételezések szerint a dohányzás következtében a periférián kialakuló vazokonstrikció eredményeként csökken az *inzulin*nak a szubkután szövetekből a vérbe irányuló abszorpciója [6]. A kialakuló kölcsönhatások elkerülése érdekében a dohányzás abbahagyása erősen indokoltá válik. A leszokást követően fokozottabb vércukor-kontroll szükséges [7].

A szedatohipnotikumként alkalmazott *glutetimid* esetében a csökkent pszichomotoros hatásért (csökkent relatív biológiai hasznosíthatóság –  $F_{\text{Rel}}$  érték) – az előbbi példával ellentétben – feltehetően a dohányzás következtében kialakuló fokozott abszorpciós folyamat a felelős [8].

A H<sub>2</sub>-blokkolóval (*cimetidin*, *nizatidin*, *ranitidin*) kezelt dohányos betegek terápiaja hosszabb időt vesz igénybe, valamint a nyombélfekély kiújulási esélye sokkal nagyobb. A *cimetidin* és *ranitidin* hatása fokozódik a terápiával egyidejűleg történő *nikotin* bevitellel [9, 10]. A gyorsabb gyógyulás és a hatékonyabb terápia érdekében tanácsos a beteget meggyőzni, hogy hagyjon fel a káros szenvedéllyel.

A dohányzás hatására bekövetkező, a felszívódást jelentősen befolyásoló efflux és uptake szorongóter interakciókat külön fejezetben foglalkozunk össze.

#### *Disztribúció során bekövetkező interakciók*

A felszívódást követően a gyógyszermolekuláknak a szisztémás keringésből a célszövetekhez kell eljutniuk. A gyógyszerek eloszlása számos tényezőtől függ (pl. szöveti vérellátás, a gyógyszer szövetek iránti affinitása), ám a kölcsönhatás létrejöttének szempontjából a plazmafehérjékről való leszorításnak van nagy jelentősége. Az  $\alpha_1$  savas glikoprotein ( $\alpha_1$ -AGP) elsősorban a bázikus karakterű gyógyszereket köti, ilyen például az *alprazolam*. A dohányzás növeli az AGP-k mennyiségét, ezáltal befolyásolja a gyógyszer egyes farmakokinetikai paramétereit [11]. Az *alprazolammal* végzett retrospektív vizsgálat eredményei alapján megállapítható, hogy a gyógyszer látszólagos megoszlási térfogata ( $V_d$ ) 17%-kal alacsonyabb értéket mutatott dohányosokban a nemdohányzók paramétereikhez képest [12]. Erős dohányosokban a Parkinson-kór kezelésében alkalmazott *amantadinnal* végzett vizsgálat során magasabb látszólagos megoszlási térfogat ( $V_d$ ) értéket regisztráltak. A vizsgálat során gázkromatográfiával (GC) határozták meg a plazma-, valamint a vizelet *amantadin* koncentrációját. A biológiai felezési idő ( $t_{1/2}^{\beta}$ ), a terminális eliminációs sebességi állandó ( $\beta$ ), a teljes görbe alatti terület értékének ( $AUC_{0-\infty}$ ), valamint a plazma clearance meghatározást követően, a clearance ( $Cl/\beta$ ) összefüggést alkalmazva állapították meg a látszólagos megoszlási térfogat értékét [13].

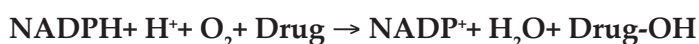
#### *Metabolikus gyógyszer-interakciók*

A gyógyszermetabolizmus során a farmakon aktív vagy inaktív, esetleg toxikus metabolitá alakul.



kul. Az átalakulás során a lipofil vegyületekből polárosabb, vízdékony és így kiüríthető metabolitok képződnek. A biotranszformáció I. fázisában a főszerepet a citokróm P-450 enzimek játsszák, az UGT-k (uridin-5'-difoszfát-glükuroniltranszferázok) pedig a fázis II. reakciók legfontosabb résztvevői, melyek glükuronizációs és egyéb konjugációs folyamatot katalizálnak. A metabolikus gyógyszerkölsönhatás során a xenobiotikum átalakulása változást szenved enzimindukció vagy enzimgátlás révén [14]. Az indukció során az enzimaktivitás fokozódásának hátterében főként a fehérjeszintézis áll, melynek következtében növekszik az enzimek szervezetben belüli mennyisége. Az indukció a clearance fokozódását is jelenti. Az enzimindukció terápiás jelentőségű, hiszen módosíthatja az alkalmazott gyógyszer hatékonyságát, melynek koncentrációja a szükséges szint alá csökken. Az enzimaktivitás fokozatosan változik, akár indukciós folyamatról, akár inhibícióról beszélünk. Számos enzimre specifikus induktor vegyületet ismerünk. Az enzimműködés fokozására nem csupán gyógyszervegyületek képesek, induktor tulajdonsággal bír például a faszélen sült grillezett húsok fogyasztása, az alkohol- és a koffeinbevitel, valamint a dohányfüst/dohányzás. A farmakokinetikai kölcsönhatások leggyakoribb megjelenési formája a metabolizmust érintő interakciós folyamatok. A mindennapi gyakorlat és a terápiás protokollok szerves része ezen interakciók ismerete, felismerése és szükség esetén a terápia korrigálása.

A citokróm P-450 enzimcsalád tagjai, vagy más néven kevert funkciójú oxigenázok a gyógyszer-metabolizmus oxidatív, I. fázisú reakciójának résztvevői. Színhelye a sima felszínű endoplazmás retikulum membránjához kötött mikroszomális poliszubsztrát monooxigenáz enzimrendszer (MFO). A citokróm-P450 izoenzimek száma jelenleg sok százra tehető, ezeket családok-



2. ábra: A CYP-450 enzimek szerepe a gyógyszer metabolizmusban

ba és alcsoportokba soroljuk a gén-nómenklatúra szerint. Osztályozásuk az adott aminosav-összetétel, illetve a génszekvenciáik azonossága, különbsége szerint történik, hiszen minden CYP-P450 enzimet specifikus gén kódol. A gének alléljai lehetnek vad típusúak – az átlagnépességben leggyakrabban előforduló allél – és variánsok. Ezen allélek kombinációi eredményezik az egyénre jellemző csökkent aktivitású, gyors vagy ultragyors metabolizációs folyamatokat. Ezt a fenotípus szerinti osztályozást másképpen a gyógyszer-metabolizáló enzimek genetikai polimorfizmusának is nevezzük. Az oxidációs folyamat lényegét tekintve elsőként egy oxigénatom épül be a molekulába, mely során a molekula egyik része a gyógyszer-molekulához kapcsolódik, másik része pedig vízzé redukálódik (2. ábra). Ezen folyamat létrejöttéhez redukált NADPH és  $\text{O}_2$  szükséges, a folyamat színhelye ennek következtében az endoplazma-retikulum foszfolipid rétege [15].

A gyógyszerek metabolizmusában legfőbb szerepet a CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5 és a 3A7 izoenzimek játsszák. Ezen enzimek indukciója és gátlása gyógyszer-interakciók kialakulását eredményezhetik. Számos ilyen enziminduktor és enzim-inhibitor vegyületet ismerünk, amelyek befolyásolhatják a citokróm enzimek aktivitását (I. táblázat). Jelentős számú enzim részt vesz a gyógyszerek biotranszformációjában. Az enziminduktor ágensek növelhetik a vegyületek metabolizmusát, ennek eredményeként csökkenhet a terápiás hatékonyság. Ezen kívül fokozhatják egy adott szubsztrát aktív metabolittá való átalakulását, ily módon növelve a vegyület potenciális toxicitását [15-18].

I. táblázat

A citokróm enzimek aktivitását befolyásoló tényezők

Fontos tényezők	CYP											
	1A1	1A2	2A6	2A13	2B6	2C9	2C19	2D6	2E1	3A	3A4	3A5
Étel	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+
Koffein	+	+										
Dohányzás	+	+	+	+	+			+	+	+	+	
Alkohol								+	+	+	+	
Gyógyszer		+				+		+	+		+	
Farmakogenomika						+		+				

+ = Interakciók lehetősége a feltüntetett izoenzimek és a befolyásoló tényezők között [17, 80-99]

## II. táblázat

A dohányzás és a nem-pszichotróp gyógyszerek között fellépő interakciók

Hatóanyagok és hatástani csoportosításuk	ATC kódok	Fellépő interakció következménye	Irodalmi hivatkozás
Antiarritmiás szerek			
I/B csoport:			
mexiletin	C01BB02	A mexiletin CYP1A2 indukciója által fokozott gyógyszer elimináció jellemző.	[73]
I/C csoport:			
flekainid	C01BC04	A fokozott clearance következtében alacsonyabb a plazmakoncentráció dohányosokban.	[22]
Egyéb:			
adenozin	C01EB10	Az aritmia kezelése során dohányosok esetében nagyobb dózis szükséges.	[52]
Analgetikumok (szintetikus opioidok, kokain)			
propoxifen	N02AC04	A gyógyszerek által közvetített fájdalomcsillapító hatás mértéke csökken a dohányos egyéneknben. A dohányzás fokozza a farmakonok metabolizmusát.	[54]
pentazocin	N02AD01	A pentazocin dózisát dohányosokban 40-50%-kal szükséges növelni.	
kokain	N01BC01	Az isémia kockázata jelentősen fokozódik.	[55]
Antihipertenzív szerek			
β-blokkolók:			
atenolol	C07AB01	A dohányzás következtében csökken a β-blokkolók szívre és vérnyomásra gyakorolt jótékony hatása. A farmakonok gyorsabb eliminációja miatt dohányosok esetében növelni kell a dózist.	[49, 50, 51]
metoprolol	C07AB02		
propranolol	C07AA05		
oxprenolol	C07AA02		
H2-receptor blokkolók			
cimetidin	A02BA01	A dohányzás csökkenti a cimetidin és a ranitidin plazmakoncentrációját. A famotidin plazmaszintje azonban nem változik. A H2-blokkolóval kezelt dohányos betegek lassabban gyógyulnak és gyakoribb a fekély kiújulása.	[9, 10]
ranitidin	A02BA02		
famotidin	A02BA03		
Nemszteroid gyulladáscsökkentők (NSAID-ok)			
diflunizal	N02BA11	A diflunzal clearance 35%-kal nagyobb dohányosokban. A fenilbutazon plazma biológiai felezési ideje csökken. Fokozott metabolizmus, a paracetamol-toxicitás veszélye nő.	[74]
fenilbutazon	N01AA01 M02AA01		[75, 76]
paracetamol	N02BE01		[76, 77]
Helyi érzéstelenítők			
lidokain	N01BB02	A metabolizáló enzimek (3A4) indukciója révén csökken a lidokain biohasznosíthatósága.	[37]
ropivakain	N01BB09	A ropivakain terápiás hatása a CYP1A2 enzim indukciós folyamatai által csökken.	[78]

A CYP1A2 enzim lényegében egy fehérje, melyet 515 aminosav épít fel, a citokróm P450 szupercsalád egyik fontos tagja [19]. Emberben kizárólag a májban található. Az 1A2 számos vegyület metabolizációjának résztvevője. Többek között szteroidok, zsírsavak, gyógyszerek biotranszformációs folyamatainak elsődleges szereplője. A CYP1A2 a vegyszerek lebontásában is részt vesz, ilyenek például a sokgyűrűs aromás szénhidrogének (policik-

lusos aromás hidrokarbonok –PAH-ok). A két és három gyűrűs PAH-ok nem karcinogének, míg számos négy, öt és hat gyűrűből álló vegyület rákkeltő hatású. A négy gyűrűs kondenzált policiklusos aromás hidrokarbonok egyik képviselője a 1,2,5,6-dibenzantracén nevű vegyület [20]. A PAH-ok közé sorolhatjuk a környezetben előforduló dohányfüstöt, a benzin és dízelolaj üzemanyagok és az oldószerek számos alkotórészét.



## III. táblázat

## Dohányzás - antidepresszáns gyógyszerek interakciói

Hatóanyagok és hatástani csoportosításuk	ATC kódok	Az interakció következménye	Irodalmi hivatkozás
Triciklusos antidepresszánsok (TCA-k)			
amitriptilin	N06AA09	A dohányfüst indukálja a májbeli gyógyszer-metabolizáló enzim (CYP1A2) működését. Csökkent antidepresszáns hatás várható.	[33]
klomipramin	N06AA04		
dezipramin	N06AA01		
imipramin	N06AA02		
nortriptilin	N06AA10		
Preszinaptikus alfa2 receptor antagonisták			
mirtazepin	N06AX11	A dohányfüst enzimindukorként hat a CYP1A2 enzim működésére.	[16, 23]
mianszerin	N06AX03		
Szelektív-szerotonin-visszavétel gátlók (SSRI-k)			
fluvoxamin	N06AB08	Feltételezhetően a CYP1A2 általi metabolizmus fokozódik. Dohányosokban jelentősen csökken a szérum koncentráció.	[34, 35]

*Interakciók a CYP1A2 enzimmel  
(antipszichotikus és antidepresszáns szerek)*

A dohányfüstben megtalálható policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok) erős induktorai a májban található citokróm P-450 1A1, 1A2 és 2E1 izoenzimeinek [21]. Egyéb vegyületek – aceton, piridin, nehézfémek, benzol, szénmonoxid, *nikotin* szintén kölcsönhatásba léphetnek az előbb említett hepatikus enzimekkel, azonban ezek hatása kevésbé jelentős. Az interakció kialakulásának következtében csökkenhet azon gyógyszerek farmakológiai hatása, amelyek metabolizmusa a fent említett enzimek közreműködésével megy végbe [22]. Számos gyógyszer metabolizmusát befolyásolja a CYP1A2 enzim indukciója révén a dohányzás. A legfontosabb farmakokinetikai interakcióban részt vevő hatástani gyógyszer-csoportokat mutatják be az összefoglaló táblázatok (II-VI. táblázat).

Az antipszichotikumok metabolizmusa fokozódik a dohányfüst hatására. A butirofenonok, a fenotiazinok és fenotiazin-származékok biotranszformációja egyaránt indukálható dohányfüsttel. Az indukció eredményeként a gyógyszerek hatásának gyengülése figyelhető meg, így esetleges dóziskorrektio (dózisemelés) válhat szükségessé [23]. Az atípusos szerek közé tartozó *klozapin* meglehetősen szűk terápiás szélességgel rendelkező gyógyszer, mely főként a CYP1A2 enzim által metabolizálódik. Dohányos és nemdohányos személyek szérum *klozapin* szintjeit vizsgálták azonos dózisével gyógyszerelés mellett. A tanulmány sze-

rint a dohányosok plazmakoncentrációja 18%-kal alacsonyabb értéket mutatott, mint a nemdohányosok esetében. A dózist illetően szignifikáns különbséget a napi 100 mg-os adagolás esetén észleltek. Egy másik retrospektív vizsgálat során 86%-kal fokozott clearance-értéket regisztráltak dohányosokban [24]. A skizofrénia és a bipoláris mániás depresszió kezelésében hatásosnak bizonyuló *olanzapinnal* szintén számos kontrollált vizsgálatot végeztek. A résztvevőket dohányzási szokásaik alapján, a napi elszívott cigarettamennyiség szerint csoportosították. Mindegyik vizsgált személy napi egyszer reggelente 10 mg *olanzapint* kapott (Zyprexa®). Az adott időpontokban levett vérmintákból HPLC segítségével határozták meg a plazmakoncentrációt. A meghatározott paraméterek világosan mutatják, hogy a gyógyszer farmakokinetikáját milyen mértékben befolyásolhatja a dohányzási szokás (3. ábra). Az adatok alapján megállapítható, hogy jelentős az eltérés a csoportokat tekintve a hatóanyag plazmaszint csúcskoncentráció eléréséhez szükséges idő ( $t_{max}$ ), a maximális plazmakoncentráció ( $C_{max}$ ), a teljes görbe alatti terület ( $AUC_{0-\infty}$ ) értékeit illetően, valamint a megoszlási és eliminációs értékeket összehasonlítva egyaránt különbség mutatkozik. Az  $AUC_{0-\infty}$  értékei növekvő sorrendben a következők: erős dohányosok < gyenge dohányosok < nemdohányosok. A legmagasabb clearance (Cl) érték az előbbiekből következően az erős dohányzási szokásokkal rendelkező személyeknél mutatkozott (49,7 l/h vs. 11,2 l/h) [28]. A korábbiakban leírtak alap-

IV. táblázat

## Dohányzás – szedatohipnotikumok/anxiolitikumok között fellépő interakciók

Hatóanyagok és hatástani csoportosításuk	ATC kódok	Fellépő interakció következménye	Irodalmi hivatkozás
<b>Benzodiazepinek (BDZ)</b>			
<i>alprazolam</i>	N05BA12	Enzimindukció következtében fokozott metabolizmus, csökkent szedatív hatás várható. A <i>nikotin</i> CNS-re gyakorolt hatása révén gyengébb lesz a terápiás hatás.	[11, 12]
<i>diazepam</i>	N05BA01		
<i>lorazepam</i>	N05BA06		
<i>oxazepam</i>	N05BA04		
<i>diazepam</i>	N05BA01	Dohányosok esetén nagyobb dózisu BDZ szükséges.	[53]
<i>klórdiazepoxid</i>	N05BA02		

V. táblázat

## A dohányzás és a perifériás támadáspontú izomrelaxánsok interakciói

Hatóanyagok és hatástani csoportosításuk	ATC kódok	Fellépő interakció következménye	Irodalmi hivatkozás
<b>Közepes hatástartamú, nem depolarizáló izomrelaxánsok</b>			
<i>atrakurium</i>	M03AC04	Dohányosok esetén 25%-kal nagyobb dózis szükséges a hatás fenntartásához. Alacsony dózisu <i>nikotin</i> stimulálja a neuromuszkuláris junkciót, nagyobb dózisu <i>nikotin</i> blokkolja a transzmissziót.	[47, 79]
<i>rocuronium</i>	M03AC09		
<i>vecuronium</i>	M03AC03		

VI. táblázat

## Dohányzás – antipszichotikumok interakciói

Hatóanyagok és hatástani csoportosításuk	ATC kódok	Fellépő interakció következménye	Irodalmi hivatkozás
I. generációs antipszichotikumok			
Fenotiazinok:			
klórpromazin	N05AA01	Metabolikus CYP1A2 enzimindukciós folyamat. Az antipszichotikumok mellékhatásai gyakoribbá válnak.	[70]
flufenazin	N05AB02		
perfenazin	N05AB03		
Tioxantének:			
tiotixen	N05AF04	Dohányosok számára nagyobb antipszichotikum dózis szükséges.	[71]
Butirofenonok:			
haloperidol	N05AD01	Dohányosokban a farmakon 44%-kal nagyobb clearance-értéke jellemző az CYP1A2 indukciója révén	[30-32]
II. generációs antipszichotikumok			
Dibenzepinek:			
klozapin	N05AH02	Fokozott gyógyszermetabolizmus a CYP1A2 enzimindukciója révén. Nagyobb dózis szükséges dohányosok esetében.	[25-29]
olanzapin	N05AH03		
zotepin	N05AX11		
Egyéb heterociklusos vegyületek:			
szertindol	N05AE03	A farmakon gyorsabb clearance-e jellemző dohányosokban.	[72]

ján az antipszichotikus kezelés során a gyógyszer terápiás monitorozása (TDM) indokoltá válik a terápia hatásosságának érdekében. Ezek értelmében figyelembe kell venni az *olanzapinnal* kezelt

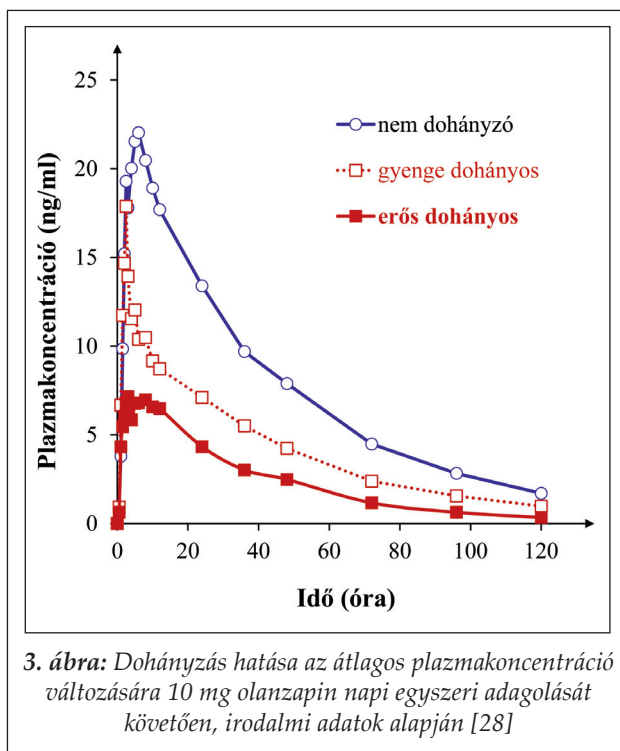
beteg dohányzási szokásait, testsúlyát, egyéb módosító tényezőket és amennyiben lehetséges regisztrálni kell a plazmakoncentrációt. A farmakokinetikai adatok elemzésével könnyebben tervez-

hető a beteg egyéni gyógyszeres adagolása [26]. Amennyiben a beteg szeretne leszokni a dohányzásról, a dózist fokozatosan kell csökkenteni a mellékhatások és a toxikus hatások elkerülése érdekében [25]. Értelemszerűen amennyiben a nemdohányzó *olanzapinnal* kezelt páciens rászokik a dohányzásra, a dózist ajánlatos fokozatosan 1,5-szeresére növelni [27-29]. Ezek az adatok fontos információt adnak az individuális terápia helyes beállításához.

A skizofrénia terápiájában alkalmazott *haloperidol* metabolizmusa szintén indukálható dohányfüst által. Biotranszformációja fokozódik a CYP-enzimek és glukuronizációs folyamatok indukciója révén, melynek eredményeként 44%-kal nő a *haloperidol* clearance értéke [30-32]. Az antidepresszánsok atípusos szereit közé sorolható *mirtazapin* és *mianszerin* a preszinaptikus  $\alpha_2$ -receptor gátlói. A triciklusos szerekhez hasonlóképp e gyógyszerek vérszintje is módosul dohányfüsttel való tartós expozíció során [23]. Mivel a depresszióval kezelt betegek körében magas a dohányosok száma, ezért a terápia hatékonysága szempontjából lényeges, hogy lehetőség szerint olyan farmakont alkalmazzunk, amely esetében az interakciós mechanizmus kizárható. A *maprotilin* terápiás hatékonyságát klinikai vizsgálatok szerint nem befolyásolja a dohányzási szokás [33]. A *fluvoxamin* hatóanyagot tartalmazó *Luvox®* orális készítmény FDA (Food and Drug Administration) által kiadott előírásában figyelmeztet, hogy a dohányzás következtében 25%-kal fokozódik a gyógyszer metabolizmusa, tehát szükségessé válik a dózis emelése krónikus dohányos betegek esetében [34, 35]. Az antipszichotikus szerek és a dohányzás között fellépő legfontosabb interakciók a VI. táblázatban láthatók.

#### Interakció a CYP3A enzimmal

A CYP3A enzim és a dohányzás között fellépő esetleges interakció lehetőségét számos vizsgálat támasztja alá. A teljesség kedvéért azonban meg kell említeni, hogy ez az induktorhatás valószínűleg szubsztrátfüggő. Ilyen CYP3A szubsztrát többek között az előrehaladott kolorektális karcinóma kezelésében alkalmazott *irinotekán*, melynek farmakokinetikáját bizonyítottan befolyásolja a dohányzás. Az interakció feltehetően a *nikotin* CYP3A enzimre kifejtett indukciós mechanizmusának köszönhető [36]. A *propoxifen* analgetikus aktivitásának csökkenése, valamint a *lidokain* fokozott metabolizmusa a dohányzás által közvetí-



3. ábra: Dohányzás hatása az átlagos plazmakoncentráció változására 10 mg olanzapin napi egyszeri adagolását követően, irodalmi adatok alapján [28]

tett enzimindukciós folyamatokkal magyarázható. A *lidokain* esetében a fokozott metabolizmust gyorsabb elimináció követi, amely csökkent biohasznosulást eredményez. A dohányzók és a nemdohányzók  $AUC_{0-\infty}$  értékei (15,2 dohányosok vs. 47,9 nemdohányzók) szignifikáns eltérést mutatnak [37].

#### Interakció az UGT (uridin-5'-difoszfát-glükuronil-transzferáz) enzimekkel

Bár a metabolikus interakciók legnagyobb részét a CYP enzimek indukciója vagy gátlása eredményezi, fontos megemlíteni az UGT-k enzimatis interakcióit is. A metabolizmus II. fázisában a legfontosabb enzimek az uridin-5'-difoszfát-glükuronil-transzferázok családjába tartoznak. A gyógyszerek metabolizmusában legfőbb szerepe az UGT1A családnak van [38]. Az előzőekben már említett tumorgátló hatású *irinotekán* aktív metabolitja, az SN-38 átalakulása inaktív SN-38G-vé az UGT1A1 katalizálásával történik. A cigaretta egyes adalékanyagai specifikus induktori az előbb említett enzimnek. Mindezek következtében csökken az *irinotekán* aktív metabolitjával való szisztémás expozíció lehetősége, ezáltal kisebb lesz a terápiás hatás. Az interakció elkerülése és a terápia hatásossága érdekében a dohányzás abbahagyása, vagy a tumorellenes szer dózisának emelése javasolt [36].

*Az eliminációs folyamat során bekövetkező interakciók*

A *heparin*-származékok és a dohányzás között fellépő interakció mechanizmusa egyelőre nem tisztázott. Vizsgálatok támasztják alá azonban a tényt, miszerint dohányosokban fokozott kiürülés és csökkent biológiai felezési-ideő ( $t_{1/2}$ ) jellemző a *heparin* farmakokinetikáját tekintve [39]. A nemdohányzókra jellemző 0,97 órás biológiai felezési időhöz képest rövidebb (0,62 óra) ugyanezen paraméter értéke dohányosokban [40]. Mindezek alapján indokolt a dohányzási szokások figyelembevétele az antikoaguláns terápia megkezdésekor.

Fontos megemlíteni az *aszcorbinsav*-dohányzás között fellépő interakciót. A dohányosok esetében jellemzően alacsonyabb a szérum *aszcorbinsav*-koncentráció a nemdohányzók plazmaszintjéhez képest. A csökkent plazmaszint feltehetően a metabolikus folyamat során lezajló interakciónak köszönhető. Csökkent abszorpció, fokozott eliminációs mechanizmus egyaránt befolyással lehetnek a *C-vitamin* szérumkoncentrációjára. Farmakokinetikai vizsgálatok eredményei bizonyítják, hogy a plazmakoncentráció növekedése nem dóziszfüggő (nem lineáris farmakokinetika). 200 mg orális dózist meghaladó dózisok esetén már nem tapasztaltak jelentős szérum-koncentrációszint emelkedést. Ezek alapján javasolt a dohányosok napi *aszcorbinsav* dózisát napi 124-200 mg-ra emelni [41].

**Farmakodinámiás interakciók**

Farmakodinámiás interakció alatt a gyógyszer szervezetre adott azon válaszát értjük, amely valamely befolyásoló tényező hatására módosul. A dohányzás okozta farmakodinámiás interakciók kialakulásáért főként a *nikotin* felel. A *nikotin* lényeges hatást fejt ki a neuromuszkuláris junkcióra, a vegetatív ganglionokra, és a központi idegrendszerre egyaránt [42]. Az ionotrop receptorok családjába tartozó *nikotinos* acetil-kolin (n-Ach) receptor kationokra áteresztő, melynek során a  $K^+$ - és  $Na^+$ -ionok áramlását az elektrokémiai gradiens határozza meg [43]. Alapvetően két csoportját különböztetjük meg: az izom- és a neurális típusú receptorokat, amelyek alegységeikben térnek el egymástól. A *nikotin* a szívizomra közvetlen hatással van: először izgatja, majd bénítja azt. A pulzust emeli, szimpatikus túlsúlyt okoz. A vágusizgalom következtében a vérnyomás először csökken, majd az adrenalin kiáramlását követően emelkedik. A gasztrointesztinális traktus-

ra szintén stimuláló, perisztaltikát fokozó hatással van. Fontos megemlíteni mindezek mellett a várandós méhre gyakorolt súlyos vazokonstriktor hatását. A központi idegrendszerben a perifériás hatásokhoz hasonlóan először stimuláns jellegű változásokat, majd ezt követően gátlást idéz elő. Hatást gyakorol a légzőközpont, a hányásközpont, a vazomotorcentrumra. A striatumban acetil-kolin felszabadulást okoz, az extrapiramidális rendszerben fokozza a dopamin kiáramlását [44]. A *nikotin* farmakológiai hatásai a nemdohányzók és a krónikus dohányosokat tekintve eltérőek. Az előbbi esetben ugyanis akut hatásokról beszélhetünk, az utóbbi során azonban a *nikotin* okozta dependencia kialakulásával is számolni kell [45]. A dohányzáshoz való hozzászokás a *nikotin* pszichés hatásainak köszönhető, melyek lehetnek stimulatívak és anxiolitikusak egyaránt. Stimuláns hatását a mezolimbikus rendszer dopaminerg neuronjain fejt ki dopamin felszabadítás révén. A *nikotin* stresszhelyzetben fellépő nyugtató hatása szintén a *nikotinos* acetil-kolin receptoron keresztül valósul meg [46].

*A neuromuszkuláris junkció n-Ach receptorai által közvetített hatások*

A neuromuszkuláris junkció az a pont, ahol az idegingerület az izomrostra átvődik. A szinapszisban nikotinérzékeny acetil-kolin receptor található. A *nikotin* a motoros végkészülékben depolarizál, ingerlő hatású. Állatkísérletek bizonyítják az összes izomcsoportra kiterjedő fibrillációs hatását. Az ingerlés azonban csak átmeneti hatás, az ezt követő bénulás légzésdepresszióhoz vezet. A neuromuszkuláris junkció n-Ach receptorain antagonistá farmakonként ható *vekurónium* nem depolarizáló típusú izomrelaxáns. Vizsgálatok támasztják alá a tényt, hogy a *vekurónium* eredményes hatású dózisa dohányosokban 25%-kal magasabb, mint nemdohányzókban. A fennálló farmakodinámiai kölcsönhatás mechanizmusa egyelőre nem teljesen tisztázott. A *vekurónium*mal kezelt dohányos betegek vizsgálata során az izomrelaxáns hatás monitorozására relaxográfot alkalmaztak. A teszt alapján beigazolódott, hogy a dohányosok rezisztensebbek az izomrelaxáns hatásával szemben. Az előbbieket igazolására szolgáló effektív dózis értékek ( $ED_{95}$   $\mu\text{g/kg}$ ) a következő eltérést mutatták: 61,38  $\mu\text{g/kg}$  dohányosokban vs. 47,49  $\mu\text{g/kg}$  nemdohányzókban. Az alacsonyabb dózisú *nikotin* stimuláló hatással van a neuromuszkuláris junkcióra, míg nagyobb dózisban a receptorok deszenzitizációja révén blok-



kolja a transzmissziót. Az erős dohányosok plazma *nikotin* koncentrációja nem haladja meg a 75 ng/ml értéket, tehát a dohányzás során felszívódott *nikotin* stimuláns hatása csökkenti az izomrelaxáns terápiás hatékonyságát. Feltehetően más jellegű interakciós mechanizmus (enzimindukciós folyamatok) eredményeként a dohányos egyének esetében nagyobb dózisú *atracurium* szükséges a megfelelő terápiás hatás elérése érdekében [47].

*A vegetatív ganglionok n-Ach-receptorai által közvetített hatások*

*A szívre és érrendszerre, valamint a vesére ható szerek és a nikotin interakciói*

A dohányzás és a béta-blokkoló vegyületek között fennálló farmakodinámiás interakció lényegében a cigaretta *nikotin* tartalma és a szívre ható farmakonok ellentétes farmakológiai hatásán alapul. Ezek a szerek a különböző fiziológiai mechanizmusokra gyakorolt jótékony hatásaiknak (mint például: a csökkentett kardiális teljesítmény, a csökkentett szívritmus és izomerő, a mérsékelt automácia az ingerképző területeken és a katekolaminok toxicitásának csökkentése) köszönhetően váltak a klinikai felhasználás nélkülözhetetlen elemeivé [48]. A dohányzás-  $\beta$ -antagonisták között fennálló kölcsönhatás során a  $\beta$ -blokkolók által közvetített kedvező terápiás hatásokat a *nikotin* negatívan befolyásolja: fokozza a szívfrekvenciát, növeli a vérnyomást és súlyosbítja az ischaemiás tüneteket, ezáltal csökkenti az antihipertenzív és antianginás terápia eredményességét. A dohányzás okozta hatásgyengülést retrospektív vizsgálatok bizonyítják a *propranolol*, a *metoprolol* és az *atenolol* esetében egyaránt [49–51]. A hipertónia és az angina terápiájának megkezdésekor lényeges a dohányos páciens felvilágosítása, miszerint kedvezőbb terápiás hatás várható amennyiben leszokik a dohányzásról.

Az *adenozin* antiarritmiás felhasználása a farmakon atrioventricularis-átvezetésre gyakorolt gátló hatásának köszönhető. Az *adenozin* hatása *nikotin* jelenlétében fokozódik: mind a szívfrekvenciára, mind pedig a diasztolés vérnyomásra kifejtett hatása növekszik, valamint az AV-átvezetést is hosszabb időre blokkolja [52].

*A nyugtatók, altatók, anxiolitikus szerek és a nikotin interakciója*

A benzodiazepinek számos tagja – lásd a fent em-

lített vegyületek – és a dohányzás között farmakokinetikai interakció áll fenn. Szükséges szót ejteni azokról a gyógyszervegyületekről is, amelyek esetében a farmakokinetikai paraméterek változatlanok, a hatás azonban eltérő lesz a dohányosok terápiája során. A csökkent szedatív hatásért és a mérséklődő aluszékonyságért feltehetően a *nikotin* a felelős, amely növeli a szervezet szimpatikus aktivitását, ezáltal mintegy kioltja a benzodiazepinek anxiolitikus hatását. *Nikotin* indukálta farmakodinámiás interakciót a *diazepam* és a *klórdiazepoxid*, valamint a „Z-szerek” közé sorolandó ultrarövid hatású altatószer, a *zolpidem* esetében írtak le [53]. A klinikai vizsgálatban erős dohányos egyénekben a *zolpidem* terápiás hatását regisztrálták, amelynek során a résztvevők szedatív hatásról nem számoltak be. Az interakció hátterében feltehetően a *nikotin* központi idegrendszerre gyakorolt stimulatív hatása áll.

*Szintetikus opioidok és a kokain interakciója nikotinnal*

A napjainkban már ritkábban alkalmazott benzomorfán-szerkezetű *pentazocin* azonos dózisa eltérő fájdalomcsillapító hatást eredményez dohányos és nemdohányzó pácienseket vizsgálva. Dohányos egyénekben, illetve magasabb légszennyezetséggű városi betegek esetében az azonos analgetikus hatás kiváltásához szükséges kevert agonista/antagonista típusú *pentazocin* dózissát 40-50%-kal kell növelni a nemdohányzók szükséges adagjához képest. A *propoxifen* analgetikus aktivitását szintén csökkenti a dohányzás [54]. A *kokain*-dohányzás farmakodinámiás interakció során az alfa-receptor *nikotin* által közvetített artériás vazokonstrikció, továbbá a szívizom fokozott oxigénigénye jellemző. A *kokain* fogyasztás mellett a dohányzási szokás additív jelleggel növeli a miokardiális isémia kockázatát [55].

*Az orális fogamzásgátlók – dohányzás farmakodinámiás interakciója*

Az orális fogamzásgátlók – dohányzás interakciók a következmények és a kölcsönhatás okozta kockázatok súlyossága révén nagy jelentőséggel bírnak. A fogamzásgátlók kinetikáját érintő interakciók mellett farmakodinámiás kölcsönhatások is jellemzik a gyógyszercsoport bizonyos tagjait. Statisztikai adatok szerint az USA-ban a felnőtt nők 17%-a dohányzik. A dohányos nők 22%-a a 25-44 éves korosztályba sorolható [56]. Tekintve, hogy szerte a világon fokozatosan emelkedik a fogam-



zóképes korú nők körében az *orális fogamzásgátlót* használók aránya és a hölgyek dohányzási kedve szintén fokozódik, ezzel párhuzamban az interakció kialakulásának az esélye is növekszik. A kölcsönhatás következtében emelkedik a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának kockázata, különösen a 35 év feletti nők esetében. Fokozódik a tromboembólia, a miokardiális infarktus és a stroke kialakulásának esélye, valamint magasabb arányban jelentkeznek menstruációs zavarok [57]. Az *orális fogamzásgátlók* plazmalipidekre és a koagulációs paraméterekre gyakorolt mellékhatásai a dohányzás hatására felerősödnek, ezáltal is fokozódik a kardiovaszkuláris-betegségek kialakulásának kockázata [58, 59]. Az FDA a 35 év feletti dohányos nők számára az orális tablettáktól eltérő fogamzásgátló módszert javasol [60]. A csupán *progesztogént* tartalmazó készítmények alkalmazása megfelelőnek bizonyult erős dohányos hölgyek esetében.

#### *Az inhalációs kortikoszteroidok és a dohányzás interakciója*

Az inhalációs szteroidok alkalmazása során farmakodinámiai interakció lép fel a dohányfüsttel történő expozíció következtében. A *beklometazonnal* végzett vizsgálatok igazolják, hogy a farmakon részecskeméret profilja megváltozik dohányfüst hatására. A vizsgálat során beklometazon-hidrofluoralkán (BDP-HFA) adagolószelepes inhalátor szóródási részecskeméret-eloszlását elemezték dohányfüsttel szennyezett környezetben és egyszerű levegő környezetében. A részecskeátmérők széles skáláját vizsgálták. A 0,3  $\mu\text{m}$ -tól az 5,1  $\mu\text{m}$ -es részecskeméretig terjedő skála koncentráció eloszlását regisztrálták. Terápiás szempontból hatékony részecskeméret tartomány a 0,3-1,0  $\mu\text{m}$ , amely mindhárom kontroll vizsgálat során az egyszerű levegő környezetében 90% feletti értéket mutatott. A dohányfüsttel szennyezett környezetben a terápiás szempontból kevésbé hatékony részecskeméret-eloszlás (1,1-2,0 illetve a 2,1-3,0  $\mu\text{m}$ -es tartomány) a leginkább jellemző. Mindezek alapján megállapítható, hogy a dohányzás rontja az inhalációs szteroidok klinikai hatékonyságát. Azon asztmás vagy COPD-s betegeknek, akik a kezelésük révén inhalációs szteroidot alkalmaznak erősen indokoltá válik a dohányzásról való leszokás. Legjobb terápiás hatás elérése érdekében fel kell hívni a beteg figyelmét arra, hogy az inhalációs készüléket lehetőség szerint dohányfüst-mentes környezetben alkalmazza [61, 62].

#### **Transzporter interakciók**

A transzporter interakciók és egyre növekvő jelentőségük egy új aldiszciplínát jelentenek a gyógyszerkutatásban. A dohányzás transzporter-kölcsönhatások révén is befolyásolhatja számos gyógyszer hatásmechanizmusát. A transzporterek olyan transzmembrán fehérjék, amelyek specifikus kötődéssel jelentősen modulálhatják a szervezetbe bekerülő farmakon ADME tulajdonságait. E transzportereket két csoportra oszthatjuk: a molekulák eltávolításában, kipumpálásában szerepet játszó efflux ABC (ATP Binding Cassette) transzporterek, valamint a molekulák felvételében szerepet játszó uptake transzporterek [63].

A transzporterek szubsztrátjai között találunk számos gyógyszermolekulát, metabolitot, endogén szubsztrátot, toxint, étel molekulákat stb. A transzporterek működésének zavara betegséghez, vagy olyan állapothoz vezethet, amely a betegség gyógyítását, illetve a gyógyszer hatását módosíthatja. Az eddigi tudományos publikációk alapján feltételezhető, hogy a dohányzás befolyásolja bizonyos transzporter fehérjék működését, így módosítva számos vegyület ADME tulajdonságait. A transzporterek szubsztrát specifikusak és jelen vannak valamennyi nagyobb farmakológiai barrierben [64, 65].

A vér-agy gát funkciója – szemipermeabilis tulajdonsága révén –, hogy védelmet nyújtson a potenciálisan káros anyagokkal szemben. A vér-agy gátban található efflux transzporterek szubsztrát vegyületeik kipumpálásával megakadályozzák számos gyógyszer, mint például a proteáz gátló *saquinavir* felhalmozódását az agyban. Bizonyított, hogy a P-glycoprotein (P-gp), a Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), valamint a Multi Drug Resistance Protein (MRP) transzporter fehérjék korlátozzák az agyban a *saquinavir* felvételt. Számos vizsgálat igazolja, hogy a dohányfüstben fellelhető *nikotin* gátolja a P-gp efflux transzporter aktivitását, melynek következtében sérül a vér-agy gát védelmi funkciója. Ezáltal a *saquinavir* mennyisége felhalmozódhat az agyszövetben. Mindezek eredményeként megváltozik a xenobiotikum hatásmechanizmusa, ADME tulajdonságai, valamint súlyos neurotoxikus mellékhatás léphet fel [66].

A vese bazolaterális membránján nagy mennyiségben jelenlevő uptake Organic Cation Transporter 2 (OCT2) transzporter, amely számos vegyület (gyógyszerek, toxinok), például a hisztamin receptor antagonist *cimetidin* proximális tubuláris sejtekbe történő szállításáért (uptake) fe-

lelős. Kísérletek igazolják, hogy a *nikotin* az OCT2 transzporter aktivitásának gátlásával a különböző gyógyszerek vesébe történő felvételét akadályozza meg, így csökkentve az OCT2 által szállított vegyületek vese clearance-ét [67, 68].

A transzporter fehérjék és a dohányzás között kialakuló kölcsönhatások kutatása új irányvonal az interakciós vizsgálatok területén. A *nikotin* mellett számos egyéb transzporter fehérjét aktiváló és gátló vegyületet ismerünk, amelyek befolyásolják a gyógyszer-molekulák ADME tulajdonságait.

### Preklinikai és klinikai vizsgálatok, analitikai módszerek

#### *In vitro* technikák

A gyógyszer-dohányzás interakciók leggyakrabban a metabolikus folyamat során alakulnak ki, a dohányzás enzimindukáló hatásának köszönhetően. Az *in vivo* történéseket megfelelően reprezentálják a precíziósan vágott májszeletekkel és az izolált perfundált májjal történő enzimindukációs vizsgálatok. A gyógyszerek biotranszformációjában nem csupán a máj enzimeit, hanem egyéb szövetekben (pl.: bél, vese) előforduló enzimek is szerepet játszanak, ezért a több szerv sejtenyészeteinek integrált rendszerén alapuló vizsgálatok (IdMOC) is elterjedtek. Az *in vitro* technikákat követően a vizsgálandó anyagok (gyógyszerek) metabolitjainak azonosítását, a koncentrációk meghatározását általában tömegspektrometria/tandem tömegspektrometria (MS, MS/MS) segítségével végzik. Leggyakrabban a nagy érzékenységgű és szelektivitású tömegspektrometriás detektálást alkalmazzák [69, 100].

#### *In vivo* vizsgálatok

A dohányzás okozta negatív hatások – beleértve a gyógyszer-dohányzás interakciókat és a transzporter kölcsönhatásokat – számos súlyos egészségügyi és gazdasági következménnyel járnak [101].

Az igen költséges követéses vizsgálatokban dohányos és nemdohányzó egyének farmakokinetikai paramétereit hasonlítják össze. A kontroll csoportoktól levett vérminták plazmakoncentrációinak, valamint az egyéb farmakokinetikai paraméterek ( $t_{\max}$ ,  $C_{\max}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ) értékeinek meghatározása leggyakrabban gázkromatográfiával (GC) és nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC), ritkábban kapilláris elektroforézissel (CE)

történik [100]. A nukleáris, radiokromatográfiás és képkalkító módszerek alkalmazása napjainkban új típusú vizsgálatok lehetőségeit biztosítják.

### Összegzés

A klinikai szempontból jelentős gyógyszer-dohányzás interakciókat két módon csoportosítottuk. Összegeztük azokat a hatóanyagokat, amelyeknek megváltozik a farmakokinetikai tulajdonságuk, valamint azon vegyületeket, amelyek farmakodinámiás változást szenvednek a dohányzás következtében. A farmakokinetikai (PK) interakciók jelentős részének hátterében a dohányfüst összetevőinek enziminduktor tulajdonsága áll, míg a farmakodinámiás (PD) kölcsönhatások leginkább a *nikotin* hatásainak tudhatók be. Új tendencia a transzporter kölcsönhatások vizsgálata a dohányzás interakciókban. A gyakorlat számára – az áttekinthetőség kedvéért – készítettünk egy háttérösszefoglalót, amely a legfontosabb vegyületek terápiás és klinikai szempontból is kiemelkedő interakcióit mutatja be (*II-VI. táblázat*).

### Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészet Intézet munkatársainak, hogy hasznos tanácsaikkal segítették és támogatták a munkánkat.

### IRODALOM

1. <http://www.ervprogram.hu/cikk-statisztikai-adatok-dohanyzasrol.php> (2010).
2. EMA (CHMP): Guideline on the Development of Medicinal Products for the Treatment of Smoking. Doc. Ref. CHMP/EWP/369963/05 (2008).
3. Ivan H. Stockley: Stockley's Drug Interactions, Karen Baxter (ed.), Pharmaceutical Press, London, UK, (1999).
4. Markus Zieglermeier, Tanja Hein: Gyógyszerkölcsönhatások az orvosi gyakorlatban, Zafir Press, Budapest, (2007).
5. Lisa A. Kroon: Am. J. Health-System Pharmacy, 64, 1917-1921 (2007).
6. I. Mühlhauser, H. J. Cuppers, M. Berger: Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.), 288, 1875-1876 (1984).
7. Ivan H. Stockley: Antidiabetics, In: Karen Baxter (ed.) Stockley's Drug Interactions, Pharmaceutical Press, London, UK, p. 418-419 (2006).
8. J. W. Crow, P. Lain, F. Bochner, D. W. Shoeman, D. L. Azarnoff: Clin. Pharmacol. Ther., 22, 458-464 (1977).
9. E. J. Boyd, D. A. Johnston, K. G. Wormsley, W. N. Jenner, X. Salanson: Aliment. Pharmacol. Ther., 1, 57-65 (1987).
10. L. C. Baak, S. Ganesh, J. B. Jansen, C. B. Lamers: Br. J. Clin. Pharmacol., 33, 193-196 (1992).
11. Gachályi Béla (ed.): Bevezetés a Klinikai Farmakológiába, Springer Hungarica, Budapest, p. 20-25 (1992).
12. R. B. Smith, P. R. Gwilt, C. E. Wright: Clin. Pharmacol., 2, 139-143 (1983).

13. L. T. Y. Wong, Daniel S. Sitar, Fred Y. Aoki: *J. Clin. Pharmacol.*, 39, 81-84 (1995).
14. Kelly L. Cozza, Scott C. Armstrong, Jessica R. Oesterheld: *A gyógyszerkölcsonhatások alapelvei az orvosi gyakorlatba*, Oriold és Társai Kiadó Kft., Budapest, p. 27-37 (2003).
15. Antal János, Boda Krisztina: *Klinikai farmakológiai kislexikon*, Springmed Kiadó Kft., Budapest, p. 92 (2005).
16. Gyires Klára, Fürst Zsuzsanna (eds.): *A farmakológia alapjai*, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, p. 68-74 (2011).
17. Lori E. Shapiro, Neil H. Shear: *J. Am. Acad. Dermatol.*, 47, 467-484 (2002).
18. Tom Lynch, Amy Price: *Orvostovábbképző Szemle*, 15, 47-53 (2008).
19. <http://www.uniprot.org/uniprot/P05177> last modified: 2012.02.
20. Bellah O. Pule, Lesego C. Mualefe, Nelson Torto: *Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil with Agilent SampliQ QuEChERS, AOAC, Kit and HPLC-FD*, Application Note Environmental 2., Agilent Technologies, No: 5990-5452EN (2010).
21. Piotr Czekaj, Anna Wiaderkiewicz, Ewa Florek, Ryszard Wiaderkiewicz: *Arch. Toxicol.*, 79, 13-24 (2005).
22. Lisa A. Kroon: *Am. J. Health-System Pharmacy*, 64, 1917-1921 (2007).
23. Markus Zieglmeier, Tanja Hein: *Gyógyszerkölcsonhatások az orvosi gyakorlatban*, Zafir Press, Budapest, p. 228-236 (2007).
24. E. J. Mookhoek, A. J. M. Loonen: *Pharm. World Sci.*, 26, 180-182 (2004).
25. Birgitte Buur-Rasmussen, Kim Brøsen: *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 9, 453-459 (1999).
26. Dévai Attila, Antal István: *A gyógyszeres terápia biofarmáciai alapjai*, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, p. 114. (2009).
27. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000287/WC500055611.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000287/WC500055611.pdf). 92k, - 2012-01-10, - Text Version
28. T. Wu et al.: *Biol. Psychiatr.*, 32, 1889-1893 (2008).
29. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/001087/WC500070073.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001087/WC500070073.pdf)., 106k, - 2011-05-25, - Text Version
30. Koichi Ohara, Shigeru Tanabu, Kimiko Yoshida, Kazuhisa Ishibashi, Keiko Ikemoto, Haruo Shibuya: *Biol. Psychiatr.*, 27, 945-949 (2003).
31. Markus Zieglmeier, Tanja Hein: *Gyógyszerkölcsonhatások az orvosi gyakorlatban*, Zafir Press, Budapest, p. 238-246 (2007).
32. M. W. Jann, S. R. Saklad, L. Ereshefsky, A. L. Richards, C. A. Harrington, C. M. Davis: *Psychopharmacol.*, 90, 468-470 (1986).
33. Ivan H. Stockley: *Tricyclic, SSRIs and related antidepressants*, In: Karen Baxter (ed.): *Stockley's Drug Interactions*, Pharmaceutical Press, London, UK, p. 972-1009 (2006).
34. FDA Alert. (2008) [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2008/022235lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/022235lbl.pdf) Luvox® Tablets for oral administration (2008)
35. FDA: Drug interaction studies, [www.fda.gov/.../DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm091837.pdf](http://www.fda.gov/.../DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm091837.pdf) (2004)
36. J. M. van der Bol, R. H. J. Mathijssen, W. J. Loos, L. E. Friberg, R. H. N. van Schaik, M. J. A. de Jonge, A. S. Th. Planting, J. Verweij, A. Sparreboom, F. A. de Jong: *J. Clin. Oncol.*, 25, 2719-2726 (2007).
37. P. M. Huet, J. Leloir: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 28, 208-215 (1980).
38. Kelly L. Cozza, Scott C. Armstrong, Jessica R. Oesterheld: *A gyógyszerkölcsonhatások alapelvei az orvosi gyakorlatban*, Oriold és Társai Kiadó Kft., Budapest, p. 4., 123., 155 (2003).
39. Medicines Information Centre Pharmacy Department: *Smoking and Drug Interactions*: [http://www.mersey-care.nhs.uk/Library/What\\_we\\_do/Clinical\\_Services/Public\\_Health/Smoking\\_Interactions.pdf](http://www.mersey-care.nhs.uk/Library/What_we_do/Clinical_Services/Public_Health/Smoking_Interactions.pdf) (2007)
40. R. J. Cipolle, R. D. Seifert, B. A. Neilan, D. E. Zaske, E. Haus: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 29, 387-393 (1981).
41. Greg Kelly: *J. Clin. Ther.*, 8, 43-54 (2003).
42. Szabó Csaba, Vizi E. Szilveszter: *Kolinerg transzmisszió gátló szerek*, In: Gyires Klára, Fürst Zsuzsanna. (eds.) *A farmakológia alapjai*, Medicina Kiadó Zrt., Budapest, p. 122-129 (2011).
43. Jean-Pierre Changeux: *C. R. Biologies*, 332, 421-425 (2009).
44. Gyires Klára, Fürst Zsuzsanna: *Kábítószer-abúzus. Élvezeti szerek: A farmakológia alapjai*, Medicina Kiadó Zrt., Budapest, p. 510-548 (2011).
45. Ashley Whicker Harkrider et al.: *Hearing Res.*, 160, 73-88 (2001).
46. Deniz Yildiz: *Toxicol.*, 43, 619-632 (2004).
47. H. Teiriä, P. Rautoma, A. Yli-Hankala: *Br. J. Anaesthesia*, 76, 154-155 (1996).
48. Szabó Csaba, Vizi E. Szilveszter: *Andrenerg transzmisszió gátlók szerek: szimpatolitikumok*. In: Gyires Klára, Fürst Zsuzsanna (eds.) *A farmakológia alapjai*, Medicina Kiadó Zrt., Budapest, p. 152-165 (2011).
49. K. Fox, J. Deanfield, S. Krikler, P. Ribeiro, C. Wright: *Br. J. Clin. Pharm.*, 17, 92S-93S (1984).
50. K. Fox, A. Jonathan, H. Williams, A. Selwyn: *Br. Med. J.*, 281, 191-193 (1980).
51. Yoshio Matsui, Kazuomi Kario, Joji Ishikawa, Satoshi Hoshida, Kazuo Eguchi, Kazuyuki Shimada: *Hyperten. Res.*, (Official Journal of the Japanese Society of Hypertension), 28, 631-638 (2005).
52. Ivan H. Stockley: *Antiarrhythmics*, In: Karen Baxter (ed.): *Stockley's Drug Interactions*, Pharmaceutical Press, London, UK p. 156-194 (2006).
53. Hershel Jick, et al: *New Eng. J. Med.*, 288, 277-280 (1973).
54. Ivan H. Stockley: *Analgetics and NSAIDs*, In: Karen Baxter (ed.): *Stockley's Drug Interactions*, Pharmaceutical Press, London, UK, p. 72-129 (2006).
55. M. I. Damaj, J. E. Slemmer, F. I. Carroll, B. R. Martin: *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 289, 1229-1236 (1999).
56. *Adult Cigarette Smoking in the United States: Current Estimate*, [http://www.cdc.gov/tobacco/data\\_statistics/fact\\_sheets/adult\\_data/cig\\_smoking/index.htm](http://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/adult_data/cig_smoking/index.htm) (2010)
57. Khaled Hbejan: *Heart Views*, 12, 1-6 (2011).
58. T. M. Farley, O. Meirik, C. L. Chang, N. R. Poulter: *J. Epidemiol. Comm. Health.*, 52, 775-785 (1998).
59. L. S. Webber, S. M. Hunter, J. G. Baugh, S. R. Srinivasan, M. C. Sklov, G. S. Berenson: *Am. J. Public Health.*, 72, 266-274 (1982).
60. FDA: *Guidance for Industry Labeling for Combined*



- Oral Contraceptives: //www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM075075.pdf (2004)
61. Invernizzi, G., Ruprecht, A., De Marco, C., Mazza, R., Nicolini, G., Boffi, R.: *Respiratory Research*, 10, 48 (2009).
  62. F. J. Van Overveld, U. Demkow, D. Górecka, W. A. De Backer, J. Zieliński: *J. Physiol. Pharmacol.*, (An Official Journal of the Polish Physiological Society), 57, 273–282 (2006).
  63. Szakács G., Váradi A., Özvegy-Laczka C., Sarkadi B.: *Drug Discov. Today*, 13, 379–393 (2008).
  64. H. Glavinas, Krajcsi P., Cserepes J., Sarkadi B.: *Curr. Drug Deliv.*, 1, 27–42 (2004).
  65. Pál, Á., Kis, E., Méhn, D., Glavinas, H., Nagy, T., Mészáros, P., Báthori, Gy., Krajcsi, P., Falkay, Gy.: *Acta Pharmaceut. Hung.*, 77, 205–216 (2007).
  66. Manda V. K., Mittapalli R. K., Bohn K. A., Adkins C. E., Lockman P. R.: *J. Neurochem.*, 115, 1495–507 (2010).
  67. Cisternino S., Chapy H., André P., Smirnova M., Debray M., Scherrmann J. M.: *AAPS J.*, 15, 299–307 (2013).
  68. Chiba S., Ikawa T., Takeshita H., Kanno S., Nagai T., Takada M., Mukai T., Wempe M. F.: *Toxicol.*, 310, 98–103 (2013).
  69. Bak István: *Műszeres analitikai technikák a gyógyszerészi és bioanalitikai vizsgálatokban. Egyetemi jegyzet*, ISBN Kiadó, Budapest, p. 113–127 (2011).
  70. M. Chetty, R. Miller, S. V. Moodley: *Euro. J. Clin. Pharmacol.*, 46, 523–526 (1994).
  71. L. Ereshefsky, M. W. Jann, S. R. Saklad, C. M. Davis, A. L. Richards, N. R. Burch: *Biol. Psychiatry*, 20, 329–332 (1985).
  72. Richard Granneman, Patricia Wozniak, Tram Tran-Johnson, Christopher Silber, Randall Mack: *Schizophrenia Res.*, 24, 202 (1997).
  73. M. Nakajima, K. Kobayashi, N. Shimada, S. Tokudome, T. Yamamoto, Y. Kuroiwa: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 46, 55–62 (2002).
  74. J. I. Macdonald, R. J. Herman, R. K. Verbeek: *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 38, 175–179 (1990).
  75. S. K. Garg, T. N. Ravi Kiran: *Int. J. Clin. Pharmacol. Therap. Toxicol.*, 20, 289–290 (1982).
  76. Gyires Klára, Fürst Zsuzsanna (eds.): *A farmakológia alapjai*, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, p. 664–667 (2011).
  77. L. E. Schmidt, K. Dalhoff: *Alimentary Pharmacol. Ther.*, 18, 979–985 (2003).
  78. M. J. Jokinen, K. T. Olkkola, J. Ahonen, P. J. Neuvonen: *Clin. Pharm. Ther.*, 70, 344–350 (2001).
  79. P. Rautoma, N. Svartling: *Canadian J. Anaesthesia* 45, 651–654 (1998).
  80. Kravchenko L. V., Trusov N. V., Aksenov I. V., Avren'eva L. I., Guseva G. V., Lashneva N. V., Tutel'ian V. A.: *Vopr. Pitan.*, 80, 9–15 (2011) (in Russian).
  81. Gurbel P. A., Bliden K. P., Logan D. K., Kereiakes D. J., Lasseter K. C., White A., Angiolillo D. J., Nolin T. D., Maa J. F., Bailey W. L., Jakubowski J. A., Ojeh C. K., Jeong Y. H., Tantry U. S., Baker B. A.: *J. Am. Coll. Cardiol.*, 62, 505–512 (2013).
  82. Swiger K. J., Yousuf O., Bliden K. P., Tantry U. S., Gurbel P. A.: *Curr. Cardiol. Rep.*, 15, 361 (2013).
  83. Kennedy W. K., Jann M. W., Kutscher E. C.: *Clinically Significant Drug Interactions with Atypical Antipsychotics*, *CNS Drugs*, Oct 30. (2013) [Epub ahead of print].
  84. Yamaguchi Y., Akimoto I., Motegi K., Yoshimura T., Wada K., Nishizono N., Oda K.: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 61, 997–1001 (2013).
  85. Li J., Zhao M., He P., Hidalgo M., Baker S. D.: *Clin. Cancer Res.*, 13, 3731–3737 (2007).
  86. Pouyfung P., Prasopthum A., Sarapusit S., Srisook E., Rongnoparut P.: *Mechanism-based Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by Rhinacanthus nasutus Constituents*, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, Jul 30 (2013). [Epub ahead of print].
  87. Verde Z., Santiago C., Rodríguez González-Moro J. M., de Lucas Ramos P., López Martín S., Bandrés F., Lucia A., Gómez-Gallego F.: *Smoking genes: a genetic association study*, *PLoS One*. Vol. 6, Issue 10: e26668 (2011).
  88. Jiang Yue, Sharon Miksys, Ewa Hoffmann, Rachel F. Tynedale: *J. Psychiatry Neurosci.*, 33, 54–63 (2008).
  89. Hanan Jay Pal, Deep Kwatra, Mukul Minocha, Durga K. Paturi, Balasubrahmanyam Budda, Ashim K. Mitra: *Life Sci.*, 88, 959–971 (2011).
  90. Goasduff T., Dréano Y., Guillois B., Ménez J. F., Berthou F.: *Biochem. Pharmacol.*, 52, 1915–1919 (1996).
  91. Kumar S., Earla R., Jin M., Mitra A. K., Kumar A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402, 163–167 (2010).
  92. Ronis M. J., Huang J., Longo V., Tindberg N., Ingelman-Sundberg M., Badger T. M.: *Biochem. Pharmacol.*, 55, 123–129 (1998).
  93. Li M., Chen P. Z., Yue Q. X., Li J. Q., Chu R. A., Zhang W., Wang H.: *Acta Pharmacol. Sin.*, 34, 1237–1242 (2013).
  94. Bi Y. F., Zhu H. B., Xing J. P., Liu Z. Q., Song F. R.: *Yao Xue Xue Bao*, 48, 1131–1135 (2013) (in Chinese).
  95. Iwano H., Ujita W., Nishikawa M., Ishii S., Inoue H., Yokota H.: *Effect of dietary eugenol on xenobiotic metabolism and mediation of UDP-glucuronosyltransferase and cytochrome P450 1A1 expression in rat liver*, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, Oct 21. (2013). [Epub ahead of print].
  96. He M., Jiang J., Qiu F., Liu S., Peng P., Gao C., Miao P.: *Food Chem. Toxicol.*, 57, 262–265 (2013).
  97. Dickmann L. J., vanden Brink B. M., Lin Y. S.: *Drug Metab. Dispos.*, 40, 1263–1267 (2012).
  98. Price R. J., Scott M. P., Giddings A. M., Walters D. G., Stierum R. H., Meredith C., Lake B. G.: *Xenobiotica*, 38, 574–586 (2008).
  99. Foti R. S., Dickmann L. J., Davis J. A., Greene R. J., Hill J. J., Howard M. L., Pearson J. T., Rock D. A., Tay J. C., Wahlstrom J. L., Slatter J. G.: *Xenobiotica*, 38, 264–280 (2008).
  100. Klebovich Imre: *A gyógyszer sorsa a szervezetben: farmakokinetika és gyógyszermetabolizmus*. In: Dinya Elek (ed.): *Humán gyógyszerfejlesztés (A molekulatervezéstől a terápiáig)*, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, p. 281–316 (2006).
  101. Gresz Miklós, Nagy Júlia, Freyler Petra: *Orvosi Hetilap*, 153, 334–350 (2012).

## EGFR/c-Met kettősgátlók fejlesztése és biokémiai vizsgálata

SZOKOL BÁLINT<sup>a,b</sup>, GYULAVÁRI PÁL<sup>c</sup>, BASKA FERENC<sup>a,b</sup>, IBOLYA KURKÓ<sup>a</sup>,  
GREFF ZOLTÁN<sup>a</sup>, SZÁNTAI KIS-CSABA<sup>a</sup>, ZOLTÁN ÖRFI<sup>d</sup>, PETÁK, ISTVÁN<sup>c,e</sup>,  
AXEL ULLRICH<sup>d</sup>, VÁNTUS TIBOR<sup>c</sup>, KÉRI GYÖRGY<sup>a,b,c\*</sup>, ÖRFI LÁSZLÓ<sup>a,b,f\*</sup>

<sup>a</sup> Vichem Chemie Kutató Kft.

<sup>b</sup> Racionális Hatóanyagtervező Laboratóriumok, Kooperációs Kutatóközpont, Semmelweis Egyetem

<sup>c</sup> Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Semmelweis Egyetem

<sup>d</sup> Max Planck Institute of Biochemistry, Department of Molecular Biology, München

<sup>e</sup> KPS Orvosi Biotechnológiai és Egészségügyi Szolgáltató Kft.

<sup>f</sup> Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Semmelweis Egyetem

\* Levelező szerzők

E-mail: keri@vichem.hu; orfi.laszlo@pharma.semmelweis-univ.hu

Cím: Vichem Chemie Kft.

Budapest, 1022 Herman Ottó utca 15.

Telefonszám: +36-1-487-2080

Fax: +36-1-487-2081

### Summary

Szokol B., Gyulavári P., Baska F., Greff Z., Szántai-Kis Cs., Örfi Z., Peták I., Vántus T., Kéri G.\*, Örfi L.\*: **Development and biochemical characterization of EGFR/c-Met dual inhibitors**

The epidermal growth factor receptor (EGFR) family has been well-known for more than ten years as the target of non-small lung carcinoma (NSCLC) which is one of the leading cause of mortality among the cancer types. The receptor tyrosine kinase inhibitors (gefitinib, erlotinib, lapatinib) which have been applied in the therapy, are not able to inhibit the progression of this disease perfectly because of resistance. It has been demonstrated that the amplification of mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) or secondary mutation of EGFR kinase causes the resistance against EGFR inhibitors in 18-20 percent of the cases. Clinical candidates inhibiting both of EGFR and c-Met kinases are unknown in the literature. We have developed quinoline-based inhibitors in our research project, which inhibit both kinases in submicromolar range in enzymatic assays, moreover we have demonstrated by western blot analysis that these compounds inhibit the autophosphorylation in vivo. The binding of the effective compounds was examined by in silico and docking simulations.

**Keywords:** EGFR, c-Met, synergism, NSCLC, tumor, tyrosine kinase, resistance

### Összefoglalás

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) család több mint egy évtizede ismert célpontja a nem-kissejtes tüdőcarcinómának, mely a tumoros megbetegedések között az egyik vezető halálozási ok világszerte. A klinikai gyakorlatban alkalmazott receptor tirozin kinázgátlók (gefitinib, erlotinib, lapatinib) sajnos csak a betegek egy hányadában képesek a betegség progresszióját megállítani, a tumorsejtekben fellépő mutációk nyomán kialakult gyógyszer rezisztencia miatt. Kimutatták, hogy NSCLC 18-20%-ában a mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) génjének amplifikációja, vagy az EGFR kináz másodlagos mutációja okozza az EGFR tirozin kináz gátlók elleni rezisztenciát. Napjainkig nem ismert egyetlen olyan klinikai fejlesztés alatt álló vegyület sem, mely mind a c-Met, mind az EGFR kinázokat is gátolja. Kutatási programunk keretében sikeresen fejlesztettünk kinolin-vázis inhibitorokat, melyek enzim esszéekben mindkét kinázt szubmikromoláris koncentrációban gátolják, továbbá western blot vizsgálattal kimutattuk, hogy vegyületek in vivo is gátolják az autofoszforilációt. A hatékony vegyületek kötődését in silico számításokkal és dokkolással is alátámasztottuk.

**Kulcsszavak:** EGFR, c-Met, szinergizmus, NSCLC, tumor, tirozin kináz, rezisztencia.

### Bevezetés

A nem-kissejtes tüdő karcinóma (NSCLC) az egyik vezető mortalitású tumortípus világszerte [1-3]. A tumorsejtek által használt jelátviteli utak, túlélési faktorok felderítése kiemelkedő fontosságú stratégiai eszközzé vált, melynek alkalmazása olyan gyógyszerek kifejlesztéséhez vezetett mint a Iressa<sup>TM</sup> (gefitinib), Tarceva<sup>TM</sup> (erlotinib) vagy a

### Rövidítések jegyzéke:

c-Met – mesenchymal-epithelial transition factor  
DTT – di-tio-treitol  
EGFR – epidermal growth factor receptor  
HEPES – (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid  
HGF – hepatocyte growth factor  
NSCLC – non-small-cell lung carcinoma  
NCL – Nested Chemical Library  
PBS – Phosphate-Buffered Saline  
IMAP – Immobilized Metal-Ion Affinity Partitioning

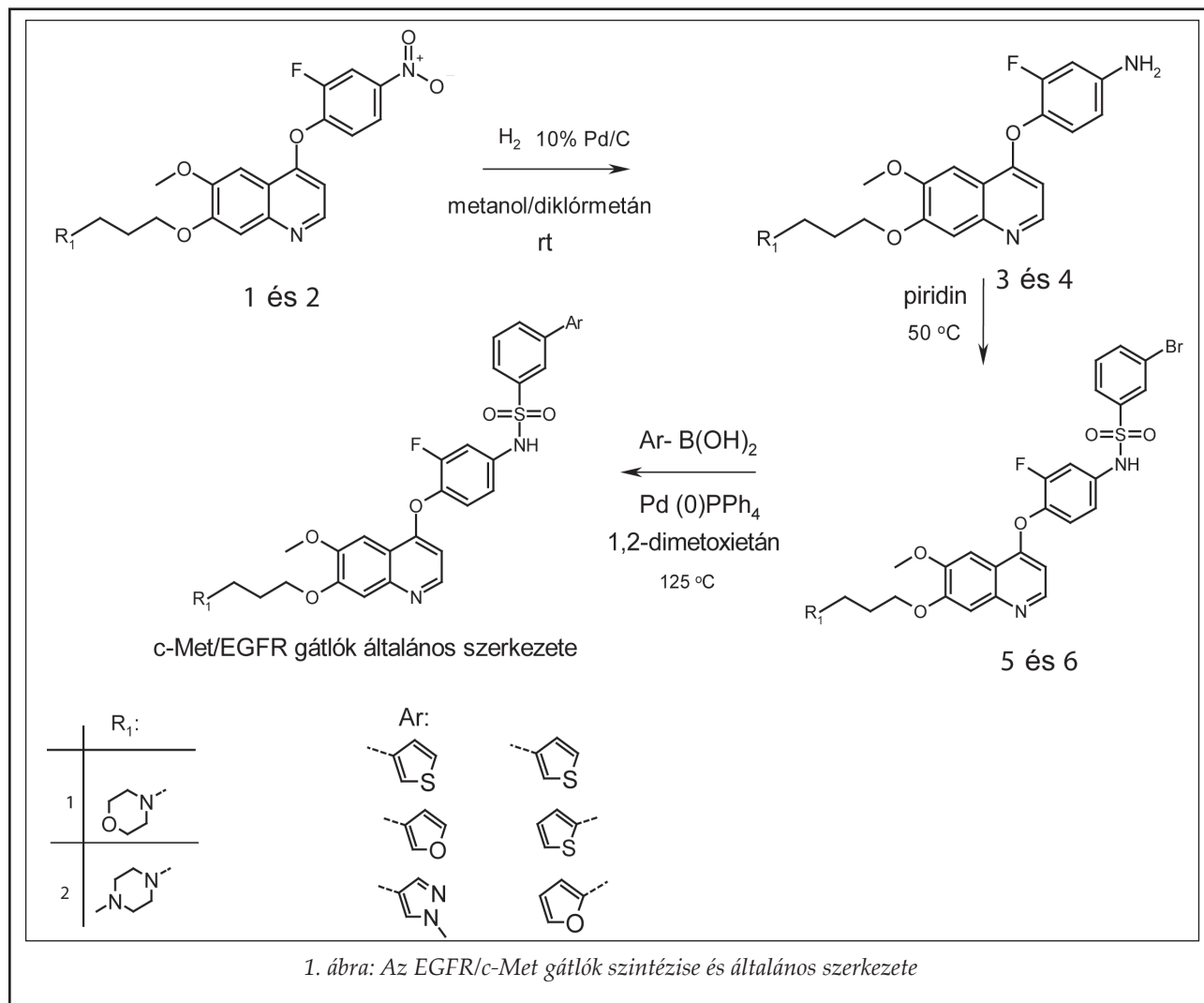


Tykerb<sup>TM</sup> (lapatinib) [4]. Az EGFR domén molekuláris diagnosztikai eszközökkel történő vizsgálata fontos az EGFR gátlók hatékonyságának feltérképezése szempontjából, ugyanis azok a tumorsejtek, amelyek aktiváló mutációt tartalmaznak (pl.: L858R pontmutációt, vagy különféle deléciókat) kielégítően reagálnak a EGFR gátlóval történő kezelésre, míg a másodlagos rezisztencia mutációt is (pl. T790M) vagy downstream KRAS mutációt tartalmazó tumorsejtek rezisztenssé válnak a kinázgátlókra, melynek következményeként a tumor már nem reagál a kezelésre [5-6].

Az EGFR (vagy másnéven: ErbB1) receptor az epidermális növekedési faktor receptorok családjába tartozik, az ErbB2 (másnéven Her2), ErbB3 és ErbB4 tirozin kinázokkal együtt. Az EGFR-ek transzmembrán receptor-kinázok, melyek több endogén ligandum hatására (EGF, TGF- $\alpha$ , epiregulin, amfiregulin) homo- vagy heterodimerizálódnak és aktiválódnak. Az EGFR-ből kiinduló PI3K-AKT, STAT, és MAPK jelútvonalak serkentik

a sejtprolifерációt, sejtdhéziót és migrációt. Közel 10 éve ismert, hogy túlműködésük (aktiváló mutáció vagy overexpresszió miatt) számos tumortípus – például a nem-kissejtes tüdőkarinómák (non-small cell lung cancer, NSCLC) – kialakulásában játszik szerepet [7].

A c-Met (másnéven *HGFR-hepatocyte growth factor receptor*) egy heterodimer transzmembrán receptor, mely szintén a tirozin kinázok csoportjába tartozik. Két részből áll: egy 50 kDa molekulatömegű extracelluláris  $\alpha$  alegységből és egy 145 kDa molekulatömegű katalitikus  $\beta$  alegységből, melyet egy diszulfid híd köt össze. A c-Met endogén ligandjához (a HGF-hez) kötődve dimerizálódik. Ez az endogén ligand egy 60 kDa méretű alfa láncból és egy 30 kDa béta láncból áll. A c-Met/HGF számos, a sejtek szempontjából létfontosságú folyamatban részt vesz: sejtprolifерáció, sejt vándorlás, angiogenezis és szövet-regenerálódás [8]. Az EGFR gátló kezelésre nem reagáló tumor sejtvonalak esetén kimutatták, hogy 18-20%-ban a rezisz-



tencia okozója a *c-Met* gén amplifikációja, illetve az EGFR és *c-Met* kinázok inhibitorokkal történő egyidejű gátlásával elérhető, hogy a tumorsejtek reagáljanak a kezelésre [9-12]. *Chen és munkatársai* leírták, hogy az MJ-56 kinazonon vázas vegyület HT-29 vastagbél tumor sejtekben csökkentette az EGFR és a *c-Met* foszforilációját, viszonylag magas 15  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban, bár a vegyületet *in vitro* esszéiben nem vizsgálták [13].

Annak ellenére, hogy EGFR gátlók gyógyszerként bevezetésre kerültek és számos további EGFR és *c-Met* gátló gyógyszerjelölt van klinikai fejlesztés alatt, tudomásunk szerint egyik vegyület sem gátolja a két kinázt egyidejűleg kielégítő mértékben. Figyelembe véve a *c-Met* és EGFR kinázok egyidejű gátlásának szükségességét, kutatócsoportunk a racionális hatóanyag tervezés eszközeivel talált és fejlesztett ki e két kinázt egyidejűleg gátló vegyületeket.

## Anyagok és eszközök

### Vegyületek

A vizsgálatokhoz felhasznált vegyületek a Vichem Chemie Kft. (Budapest, Magyarország) kinázgátló vegyülettárából származnak (Nested Chemical Library<sup>TM</sup>). Az egyéb felhasznált vegyületek a Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest, Magyarország), Alfa Aesar GmbH (München, Németország) és Apollo Scientific Ltd.-től (Birgminham, Anglia) kerültek beszerzésre. A vegyszereket további tisztítás nélkül használtuk fel.

### A vegyületek előállítása

A vegyületek előállítása a WO2007146824 lajstromszámú szabadalom alapján történt. Az **1** és **2** vegyület nitro-csoportját katalitikus hidrogénezéssel redukáltuk, majd a kapott **3** illetve **4** amino-vegyületet száraz piridinben a megfelelő aromás szulfonsav-kloriddal acileztük. Az így nyert **5** és **6** bróm származékokat mikrohullámú reaktorban reagáltattuk, palládium katalizált, ún. Suzuki-Myaura kapcsolással, a megfelelő heteroaromás boronsavakkal, telített nátrium-karbonát jelenlétében 1,2-dimetoxietán oldószerben. A kapott végtermékeket minden esetben oszlopkromatográfiával tisztítottuk (Kieselgel, kloroform/metanol rendszer) (**1. ábra**).

### *In vitro* biokémiai esszék

A rekombináns vad típusú (wt) és L858R pontmutáns EGFR kinázokat magunk expresszáztattuk

Sf9 rendszerben [14]. A rekombináns *c-Met* kinázt (Lot: 012) a ProQinase GmbH-től, a rekombináns inzulinreceptort a Proteros Biostructures GmbH-től vásároltuk.

A *c-Met* és EGFR biokémiai esszérendszerek külön-külön kerültek optimalizálásra.

Az EGFR reakciópuffer összetétele: 20 mM HEPES (pH 7,5), 1 mM DTT, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0,01% (v/v) NP40, 5% (v/v) glicerin, 0,5 mg/ml poli-GT peptid, mint szubsztrát, 7,52  $\mu\text{M}$  ATP az EGFR<sub>wt</sub> esetében és 25,2  $\mu\text{M}$  ATP az mutáns EGFR<sub>L858R</sub> esetében.

A *c-Met* reakciópuffer összetétele: 20 mM HEPES (pH 7,5), 1 mM DTT, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0,01% (v/v) Tween-20, 5% (v/v) glicerin, 0,25 mg/ml poli-AEKY peptid, mint szubsztrát és 9,6  $\mu\text{M}$  ATP.

Az InsR reakciópuffer összetétele: 20 mM HEPES (pH 7,5), 1 mM DTT, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0,01% (v/v) Brij-35, 400 nM 5'TAMRA fluoreszcens festékkel jelölt KKS RGDYMTMQIG peptid, mint szubsztrát és 12,58  $\mu\text{M}$  ATP, mint szubsztrát.

A reakciókat minden esetben 10  $\mu\text{l}$  végtérfogatban, Corning 3676 típusú, 384 lyukú, fekete polisztirol lemezeken futtattuk 1 órán át, szobahőmérsékleten. A rekombináns kinázokat olyan koncentrációban adtuk, hogy működésük 60-80 millipolarizációs egység eltolódást idézzon elő a kontrollhoz képest. A rekombináns *c-Met* kinázt a vizsgálni kívánt vegyületekkel 1 óráig preinkubáltuk, mielőtt elindítottuk volna az enzimreakciót. Az elsődleges szűrést egységesen 10  $\mu\text{M}$  [ATP] mellett végeztük, majd az  $\text{IC}_{50}$  meghatározáshoz az ATP koncentrációkat a korábban meghatározott  $K_{\text{M[ATP]}}$  értékre állítottuk. A képződött ADP kimutatására az EGFR esetében Transcreeper<sup>®</sup> ADP<sup>2</sup> (BellBrook Labs) rendszert (a saját készítésű detektáló oldat összetétele: 20 mM HEPES pH 7,5, 40 mM EDTA, 0,02 (v/v), Brij35, 3 nM ADP Alexa633 Tracer, anti-ADP antitest), a *c-Met* esetében ADPGlo (Promega) detektáló rendszert használtunk a gyártó által megadott mennyiségek kétharmadát használva. Az inzulinreceptor-mérés esetében a foszforilált szubsztrátot IMAP rendszerrel mutattuk ki (Molecular Devices) a gyártó előírásai szerint.

### Sejtviabilitás vizsgálat (MTT esszé)

Vizsgálatainkhoz klinikailag releváns, EGFR fehérje mutációt illetve overexpressziót vagy *c-Met* génamplifikációt hordozó tüdőkarcinóma sejtvonalakat használtunk.

Minden humán NSCLC sejtvonalat az ATCC-től szereztünk be (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA): A549 (vad típusú EGFR, KRAS mutáns), H1975 (L858R és T790M kettős-mutáns EGFR), HCC827 (deléciós mutáns EGFR) és H1993 (c-Met gén amplifikált). A sejtenyészeteiket 9% (v/v) magzati borjú szérummal (FBS) és antibiotikummal (MycoZap Plus-CL) kiegészített RPMI1640 médiumban tartottuk fenn (Lonza Group Ltd. Switzerland) 37 °C-os párasított inkubátorban 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó légterben.

Kezeléshez logaritmikus fázisban lévő sejtenyészetekből 8000 sejtet helyeztünk ki 96 lyukú lemezre lyukanként. 24 óra múlva kezeltük a sejteket a feltüntetett hatóanyag-koncentrációkkal. 48 óra múlva a tenyésztő médiumot eltávolítottuk és minden lyukba 50 µl 2 mg/ml MTT-t (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid) tartalmazó PBS oldatot mértünk. A tenyésztőlemezeket ezután másfél órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd az MTT oldatot óvatosan eltávolítottuk és a keletkezett formazán kristályokat 200 µl szolubilizáló oldatban (2-propanol, 1 mM HCl, 10% (v/v) Triton X-100) oldottuk fel. Abszorbanciát 570 és 635 nm-en mértünk Synergy 2 plate reader (Merck, Darmstadt, Germany) készülékkel. Az 570 nm-en mért értékekből lyukanként kivontuk a 635 nm-es értékeket és a kezeletlen, kontrollhoz (DMSO) viszonyítva kiszámoltuk az egyes lyukakban levő sejtek relatív túlélés-értékét, amikből Excel (Microsoft) és XLfit (IDBS) szoftverek segítségével számítottunk IC<sub>50</sub> értékeket. Minden IC<sub>50</sub> meghatározást legalább háromszor végeztünk el.

#### *Apoptózis vizsgálat*

Logaritmikus fázisban lévő sejtenyészetekből 24 lyukú lemezre 10-40 ezer sejtet helyeztünk ki. Másnap a jelzett hatóanyag-koncentrációkkal kezeltük 1% FBS-t tartalmazó médiumban. 24 óra múlva a felülúszókat, a tripszinEDTA-val felszedett sejtekkel együtt mintatartó csövekben lecentrifugáltuk (150 g, 10 perc, 4 °C) majd etanollal fixáltuk (70%, -20 °C). Legalább újabb 24 óra múlva a sejtpelleteket apoptózis pufferben vettük fel [200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mM citromsav pH 7,8, 100 µg/ml RNáz A (Sigma)] fél óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk és 10 µg/ml propídium-jodiddal megfestettük. Az apoptotizált sejtek arányát áramlási citométerrel mértük meg FACSCalibur készüléken, CellQuest Pro szoftver (BD Biosciences) segítségével. Minden mérést legalább három független alkalommal megismételtünk.

#### *Western blot analízis*

A petricsészékbe kihelyezett sejtenyészeteiket 24 óráig éhezettük FBS mentes tenyészoldatban. A tenyészeteiket 1 órán keresztül kezeltük a feltüntetett hatóanyag koncentrációkkal, citokinekkal indukáltuk (10 ng HGF vagy 100 ng EGF, 15 perc), majd jég-hideg PBS-el mostuk és 4 °C-on lizáló oldat jelenlétében (0,1% SDS, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% Tween-20, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 20 mM NaF és proteáz inhibitor koktél (Calbiochem)) felkapartuk. A sejt-lizátumokat fél percig ultrahanggal szonikáltuk, 20 percig jégen inkubáltuk, majd centrifugáltuk (14000g, 4 °C, 15 min). A felülúszók fehérjekoncentrációját Bradford-méréssel határoztuk meg, majd mintapufferrel kevertük össze (ötszörös töménységű oldat: 400 mM DTT, 8% SDS, 40% glicerin, 200 mM Tris-HCl pH 6,8) és 10 percig forraltuk őket. A kész mintákat -20 fokon tároltuk. A Western blot analízishez 4-50 µg fehérjét vittünk fel és futtattunk 8%-os poliakrilamid géleken (SDS-PAGE). A gélekről a szétválasztott fehérjéket nedves blot rendszerrel polivinilidén-difluorid membránokra vittük át (2 óra, 4 °C, 0,45 µm, Bio-Rad). A membránokat másfél órán át 5%-os (w/v) marha szérum albumin (BSA) tartalmú TBST pufferben (TBS with 1% (v/v) Tween-20) blokkoltuk, majd friss blokkoló oldatban elsődleges ellenanyaggal (1:1000, éjjen át, 4 °C) és megfelelő, tormaperoxidázzal konjugált másodlagos ellenanyaggal (1 óra, szobahőmérséklet) inkubáltuk. A két inkubálás között 1%-os (w/v) BSA tartalmú TBST-ben, az inkubálások után tiszta TBST-ben mostuk háromszor a membránokat. A megjelölt fehérjesávok előhívását Western Lightning Plus-ECL kemolumineszcens reagenssel (PerkinElmer) végeztük szobahőmérsékleten 0,5-5 percig CL-XPosure filmekre (Thermo Scientific, MA). Minden ellenanyagot a CellSignaling Technologies-től (Danvers, MA) vásároltunk: anti-c-Met (L41G3), anti-foszfo-c-Met (Y1234, 130H2), anti-EGFR (C74B9), anti-foszfo-EGFR (Y1068, 1H12), anti-p44/42 MAPK (3A7), anti-foszfo-p44/42 MAPK (T202/Y204), anti-AKT (40D4), anti-foszfo-AKT (S473) and anti-β-aktin.

#### *In silico vizsgálat, dokkolás*

A molekula-modellezéshez és az *in silico* kötődési modellek elkészítéséhez a Schrödinger programcsomag 2009-es verziójának moduljait használtuk: Maestro, LigPrep, Glide, Protein Preparation Wizard, SiteMap (Schrödinger Ltd., USA).

Az EGFR (1XKK) és az c-Met (3LQ8) fehérjék szerkezetét a Protein Data Bank adatbázisból töltöttük le. A Protein Preparation Wizard modul segítségével készítettük elő a fehérjét a kötőhely modellezéséhez: eltávolítottuk az ATP-kötőhely közelében található vízmolekulákat, hozzáadtuk a molekulához a hiányzó hidrogén-atomokat és a pH-t a fiziológiai pH 7,4-re állítottuk be. A ligandumok 3D struktúráit, a LigPrep modul segítségével állítottuk elő OPLS\_2005 erőteret alkalmazva úgy, hogy a molekulák töltöttségi állapota pH 7,4-re lett beállítva. Az in silico modellezés a Glide modul használatával történt kétféle módszert alkalmazva: az elsődleges screening során standard (SP), majd bizonyos vegyületek esetén a különlegesen precíz (XP) módszer alkalmazásával. A dokkoláshoz ugyancsak az

OPLS\_2005 erőteret alkalmaztuk. A kiértékelést a Maestro modul segítségével végeztük.

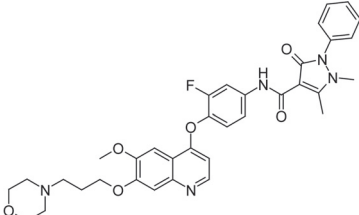
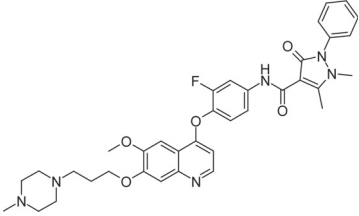
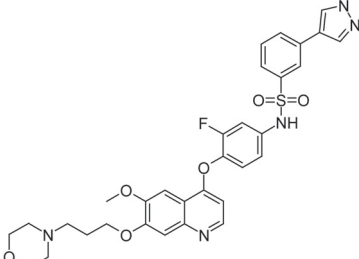
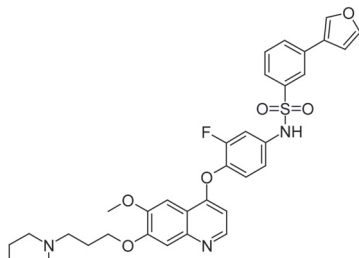
## Eredmények

### Hit-molekulák keresése és optimalizálása

A Vichem Chemie Kft. ún. Kiterjesztett Validációs Vegyülettárának (Extended Validation Library) 3000 kinázgátló molekulája került tesztelésre recombináns c-Met esszé keretében, 10  $\mu\text{M}$  koncentrációban, majd az 50%-nál nagyobb gátlást mutató vegyületek  $\text{IC}_{50}$ -ét meghatároztuk. A kapott hit-molekulákat EGFR<sub>wt</sub> esszében is vizsgáltuk, 50%-nál alacsonyabb gátlást mutató vegyületek esetén az  $\text{IC}_{50}$ -et is meghatároztuk. A első

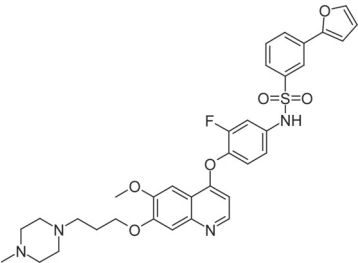
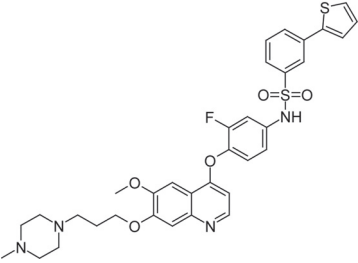
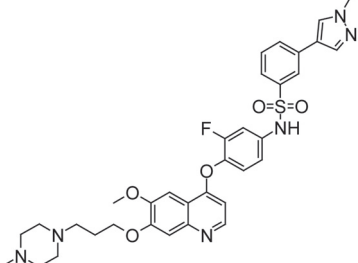
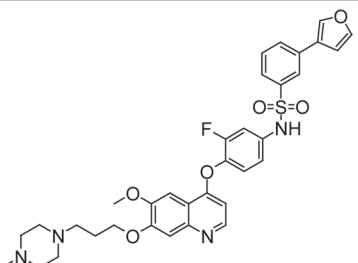
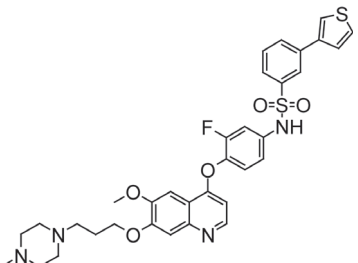
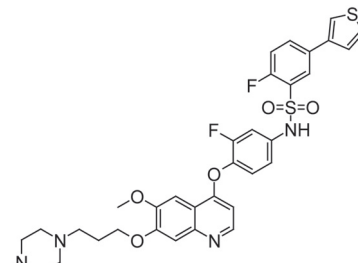
I. táblázat

Az EGFR/c-Met gátló vegyületek szerkezete és in vitro hatása

A vegyület száma	Szerkezet	c-Met $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	EGFR <sub>wt</sub> $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	EGFR <sub>L858R</sub> $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	InsR $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
7		$0,007 \pm 0,001$	>16	>16	$0,17 \pm 0,106$
8		$0,005 \pm 0,002$	$7,67 \pm 3,379$	>16	$0,039 \pm 0,029$
9		$1,719 \pm 1,427$	$1,371 \pm 0,456$	$1,969 \pm 0,738$	>12,5
10		$0,978 \pm 0,632$	$3,863 \pm 0,000$	$2,895 \pm 1,891$	>12,5

Folytatás a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

A vegyület száma	Szerkezet	c-Met IC <sub>50</sub> (μM)	EGFR <sub>wt</sub> IC <sub>50</sub> (μM)	EGFR <sub>L858R</sub> IC <sub>50</sub> (μM)	InsR IC <sub>50</sub> (μM)
11		2,705	1,907	1,900	>12,5
12		2,708 ± 1,065	1,052 ± 0,434	1,157 ± 0,459	>12,5
13		0,564 ± 0,505	0,084 ± 0,042	0,369 ± 0,288	7,867 ± 3,198
14		1,048 ± 0,404	0,168 ± 0,018	0,283 ± 0,152	5,228 ± 1,571
15		0,398 ± 0,190	0,094 ± 0,100	0,310 ± 0,083	2,872 ± 0,833
16		1,664 ± 0,489	0,572 ± 0,132	0,578 ± 0,120	>12,5

Folytatás a következő oldalon

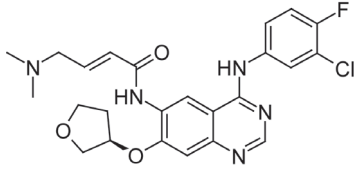
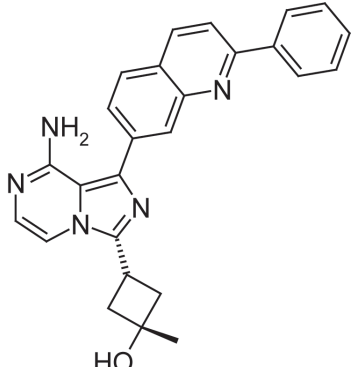


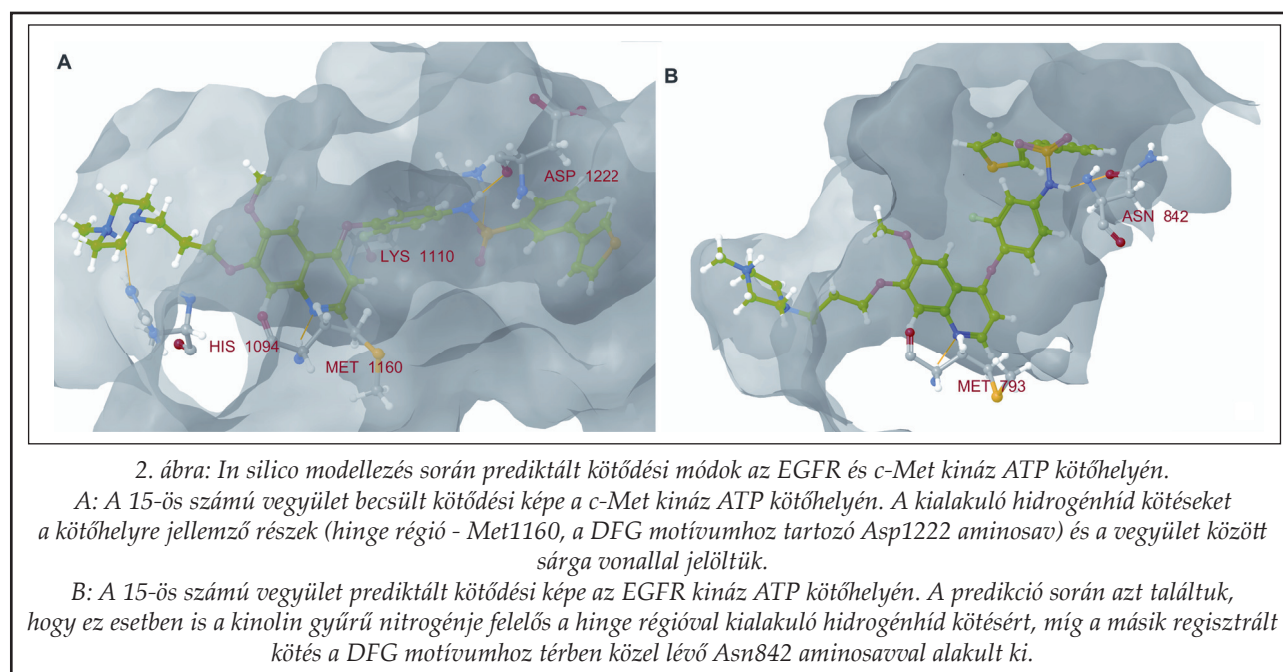
Folytatás az előző oldalról

A vegyület száma	Szerkezet	c-Met IC <sub>50</sub> (μM)	EGFR <sub>wt</sub> IC <sub>50</sub> (μM)	EGFR <sub>L858R</sub> IC <sub>50</sub> (μM)	InsR IC <sub>50</sub> (μM)
17		2,692 ± 1,187	1,200 ± 0,458	1,849 ± 0,550	>12,5
18		1,225 ± 0,633	4,354 ± 3,659	7,538 ± 1,97	>12,5
Crizotinib [15]		N.A.	>16	>16	N.A.
BMS-777607 [16]		0,007 ± 0,002	N.A.	N.A.	N.A.
Erlotinib [17]		>16	0,016 ± 0,016	0,010 ± 0,008	>12,5

Folytatás a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

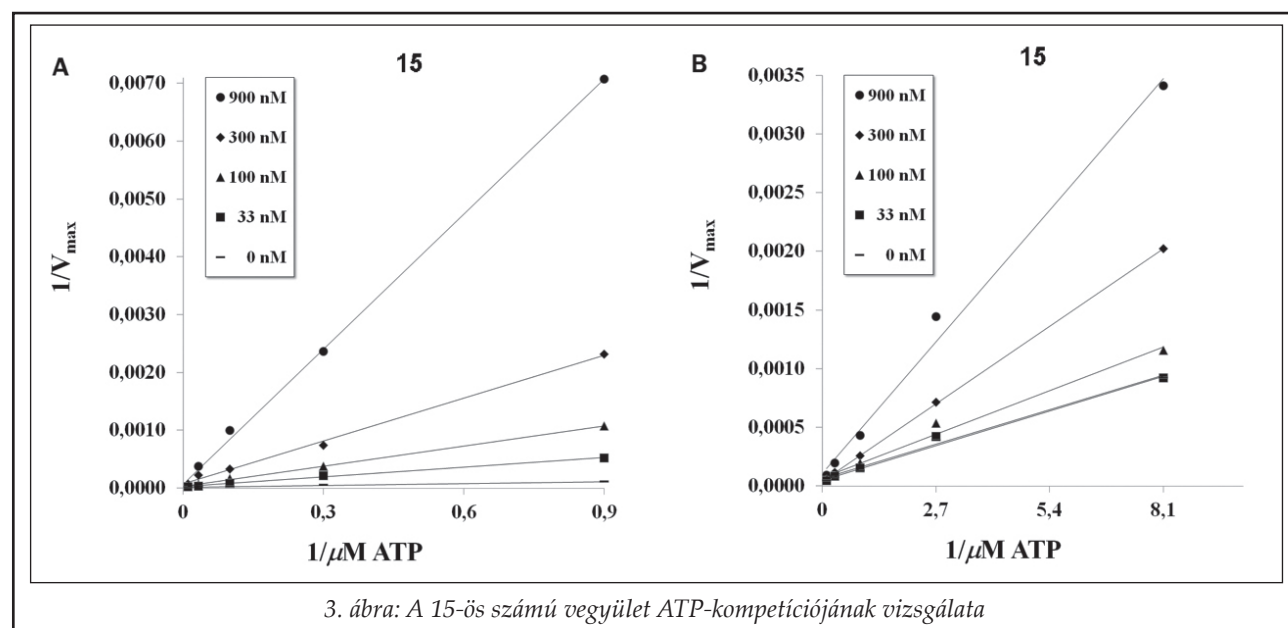
A vegyület száma	Szerkezet	c-Met IC <sub>50</sub> (μM)	EGFR <sub>wt</sub> IC <sub>50</sub> (μM)	EGFR <sub>L858R</sub> IC <sub>50</sub> (μM)	InsR IC <sub>50</sub> (μM)
Afatinib [18]		N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
OSI-906 [19]		>16	>16	>16	0,018 ± 0,008



screening során kapott vegyületek erős c-Met gátló hatást (IC<sub>50</sub> = 5-20 nM) és nem kívánatos InsR gátló hatást mutattak, valamint az EGFR enzimet 14 μM IC<sub>50</sub> érték felett gátolták (*I. táblázat*). A hit-molekulák hidrofób antipirín-savamid részét bioizoszternek feltételeztük és biaril-szulfonamid csoportra cseréltük, majd *in silico* dokkolásnak vetettük alá (*2. ábra*). Az így kapott molekulák megtartva a c-Met gátló hatásukat, az EGFR kinázt is gátolták, ezért számos származékot előállítottunk, melyeket *in vitro* esszében is vizsgáltuk.

#### *In vitro* kináz esszé eredmények

Az *in vitro* vizsgálatban összesen 12 vegyületet vizsgáltunk, referencia vegyületeként klinikai fejlesztés alatt álló c-Met és EGFR gátlókat használtunk. A vegyületek szerkezet-hatás összefüggése alapján a N-metilpiperazino-propil oldallánc hatékonyabb volt, mind a morfolino-propil származékok (*I. táblázat*) illetve a vizsgált öttagú heterociklusos gyűrűk közül esetén a 3-tienil 15 származékok bizonyult a leghatékonyabbnak. Megfigyel-



II. táblázat

Sejtviabilitás mérések  $IC_{50}$  értékei négy NSCLC sejtvonalon és NIH 3T3 nem-tumoros kontroll sejtvonalon

Vegyület száma	In vivo viabilitás gátlás [ $IC_{50}$ ( $\mu$ M)]				
	H1975	HCC827	A549	H1993	NIH 3T3
7	1,462 $\pm$ 0,924	2,514 $\pm$ 1,067	1,189 $\pm$ 0,723	0,005 $\pm$ 0,006	0,074 $\pm$ 0,046
8	1,063 $\pm$ 0,460	2,581 $\pm$ 1,491	1,244 $\pm$ 0,604	0,002 $\pm$ 0,002	N.A.
9	6,905 $\pm$ 0,908	5,007 $\pm$ 2,692	6,438 $\pm$ 2,029	5,226 $\pm$ 2,590	N.A.
10	8,932 $\pm$ 0,841	>10	8,207 $\pm$ 2,540	4,458 $\pm$ 1,766	N.A.
12	4,519 $\pm$ 0,510	5,028 $\pm$ 1,788	3,920 $\pm$ 1,028	4,028 $\pm$ 1,102	N.A.
13	6,122 $\pm$ 2,925	2,829 $\pm$ 1,674	8,849 $\pm$ 1,993	6,241 $\pm$ 2,917	2,480 $\pm$ 0,673
14	2,955 $\pm$ 0,891	2,499 $\pm$ 0,965	3,647 $\pm$ 0,403	2,690 $\pm$ 0,517	1,764 $\pm$ 0,382
15	2,302 $\pm$ 0,747	1,941 $\pm$ 0,662	4,755 $\pm$ 1,107	1,359 $\pm$ 0,440	2,350 $\pm$ 0,119
16	4,100 $\pm$ 0,645	2,820 $\pm$ 0,020	4,361 $\pm$ 3,990	4,001 $\pm$ 0,880	N.A.
17	7,708 $\pm$ 0,291	4,614 $\pm$ 1,821	6,782 $\pm$ 2,533	5,035 $\pm$ 1,587	N.A.
18	>10	>10	>10	>10	N.A.
crizotinib	7,551 $\pm$ 0,710	>10	4,084 $\pm$ 1,233	0,061 $\pm$ 0,031	0,408 $\pm$ 0,380
BMS-777607	N.A.	>10	>10	1,108 $\pm$ 0,760	0,120 $\pm$ 0,122
erlotinib	7,498 $\pm$ 1,226	0,002 $\pm$ 0,003	7,099 $\pm$ 5,025	2,043 $\pm$ 0,657	>10
afatinib	0,110 $\pm$ 0,000	1,811 $\pm$ 0,000	2,122 $\pm$ 1,404	1,073 $\pm$ 0,000	3,392 $\pm$ 3,345
OSI-906	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

N.A. – nincs adat

tük, hogy akárcsak az XL-880 (foretinib) klinikai anyag esetén, a preinkubációs idő növelésével a vegyületek alacsonyabb  $IC_{50}$  értékeket adtak. A szerkezeti hasonlóság alapján a vegyületet reverzibilis, ATP-kompetitív inhibítornak gondoltuk. Ennek igazolására többféle kináz-inhibitor koncentráció mellett mértünk enzimaktivitás értékeket és az adatokat ún. Lineweaver-Burk kettős reciprok függvényen ábráztuk. Az így kapott trendvonalak lefutása igazolta a 15-ös számú vegyület ATP-kompetitív természetét (3. ábra). Ahhoz, hogy megtudjuk, hogy a molekula pontosan hova

kötődik mindkét enzimben és teljes bizonyossággal kijelenthessük, hogy a vegyület ATP-kompetitív inhibitor, röntgenkrisztallográfiás vizsgálat volna szükséges.

#### Sejttenyészet alapú vizsgálatok és citotoxicitás

##### Viabilitás vizsgálatok

Az *in vitro* kináz mérések után ismert nem-kissejtes tüdőrák sejtvonalakon teszteltük anyagainkat. A szélesebb hatásspektrumú 7-es és 8-as

anyag kiemelkedő c-Met gátló hatásának köszönhetően pár nanomólos koncentrációban gátolta a c-Met génamplifikált H1993 és gyengébben a H1975 és A549 sejtvonalak viabilitását, egyidejűleg viszont a 7-es számú vegyület a nem-tumoros kontroll sejtvonal, a NIH3T3 túlélését is csökkentette.

A módosított alapvázú származékok (9-16 számú vegyületek) hatását általánosan pár mikromólos  $IC_{50}$  értékűnek mértük minden sejtvonalon. Ettől eltérő eredményeket négy anyagnál kaptunk.

Az enzimes mérésekben mindkét EGFR enzimet 600 nM, vagy az alatti  $IC_{50}$  értékkel gátolni képes 13, 14, 15 és 16 számú anyagok érték el a legerősebb viabilitás-gátlást az EGFR-gátló érzékeny HCC827 sejtvonalon is (ugyanannyit, mint az 1-es és 2-es anyagok). Közülük a 15 vegyület volt, amely (feltehetően relatíve legerősebb c-Met gátló hatásának köszönhetően) egyidejűleg a c-Met gátlókra érzékeny H1993 sejtvonal viabilitását is a legerősebben csökkentette a rokon vegyületeknél. Ezen kívül a 13, 14 és 15 jelű vegyületek a kontroll sejtvonal túlélését gyengébben befolyásolták, mint az 7 és 8 vegyületek vagy néhány referencia vegyület (crizotinib, BMS-777607).

A reverzibilis EGFR-gátlókra érzéketlen T790M mutáns EGFR-t expresszáló H1975 sejtvonalon is megfigyelhető volt a 7 és a 8 anyag kiemelkedő hatása, bár  $IC_{50}$  értékeik többszörösen gyengébbek voltak, mint a HCC827 vagy H1993 karcinóma vonalon mért értékeik. A H1975 sejtvonalon tapasztalt hatás is feltehetőleg a 15-ös számú anyag c-Met gátló potenciáljának tulajdonítható [9]. A KRAS mutáns, A549 sejtvonal, érzéketlen az EGFR gátlására, mivel a növekedését okozó onkogén az EGFR-hez (és a c-Met kinázhoz) képest downstream található. Valószínűleg ez az oka, hogy sem a saját anyagaink, sem a referenciaanyagok nem hatottak rajta 2 mikromól alatti  $IC_{50}$  értékkel.

#### Apoptózis indukciójának vizsgálata

A sejtvitalitás-gátlás értékek nem adnak felvilágosítást arról, hogy a megfigyelt gátló hatás milyen folyamat eredménye (sejtciklus gátlás, apoptózis vagy nekrosis). Ennek

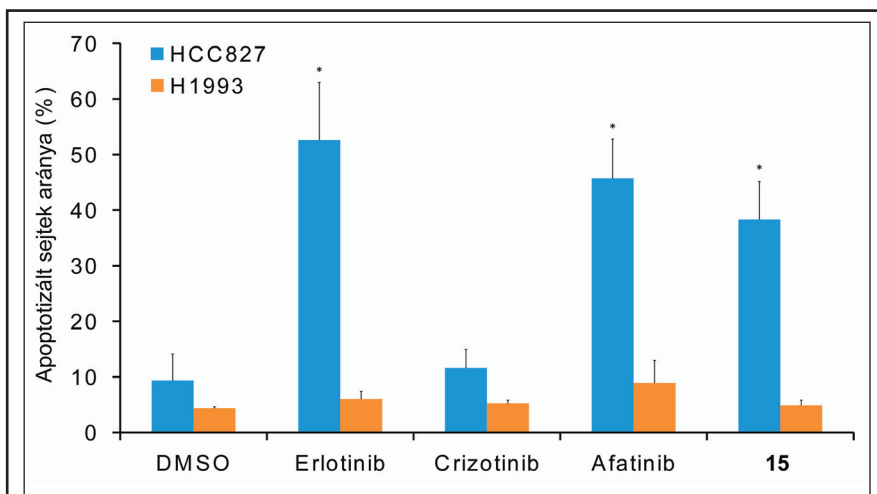
felderítésére áramlási citometriás méréseket végeztünk a 15 számú anyaggal és három referenciaanyaggal a két legfontosabb nem-kissejtes tüdőkarcinóma sejtvonalon. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a 15 számú anyag a reverzibilis (erlotinib) és irreverzibilis (afatinib) EGFR-gátlókkal megegyező mértékben indukált apoptózist HCC827 sejtvonalon. Ugyanakkor a H1993-as sejtvonalnál egyik hatóanyag esetében sem tapasztaltunk apoptózist. Ennek pontos oka ismeretlen (4. ábra).

#### Citotoxicitás vizsgálat

Ahhoz, hogy a 15 számú anyag EGFR és c-Met overexpresszált sejtekre való specificitását megvizsgáljuk, valamint következtethessünk az általános citotoxicitásra az anyagokat nem tumoros kontrollként, NIH3T3 sejtvonalakon is teszteltük. A kezdeti hitként talált vegyületek jelentős mértékben csökkentették a NIH3T3 sejtek viabilitását. (7 számú vegyület: 170 nM, illetve 8 számú vegyület 39 nM). A szulfonamid csoport bevezetésével bár csökkent a c-Met gátló hatás, nőtt a EGFR gátló hatás és a NIH3T3 sejtvonalon viabilitás.

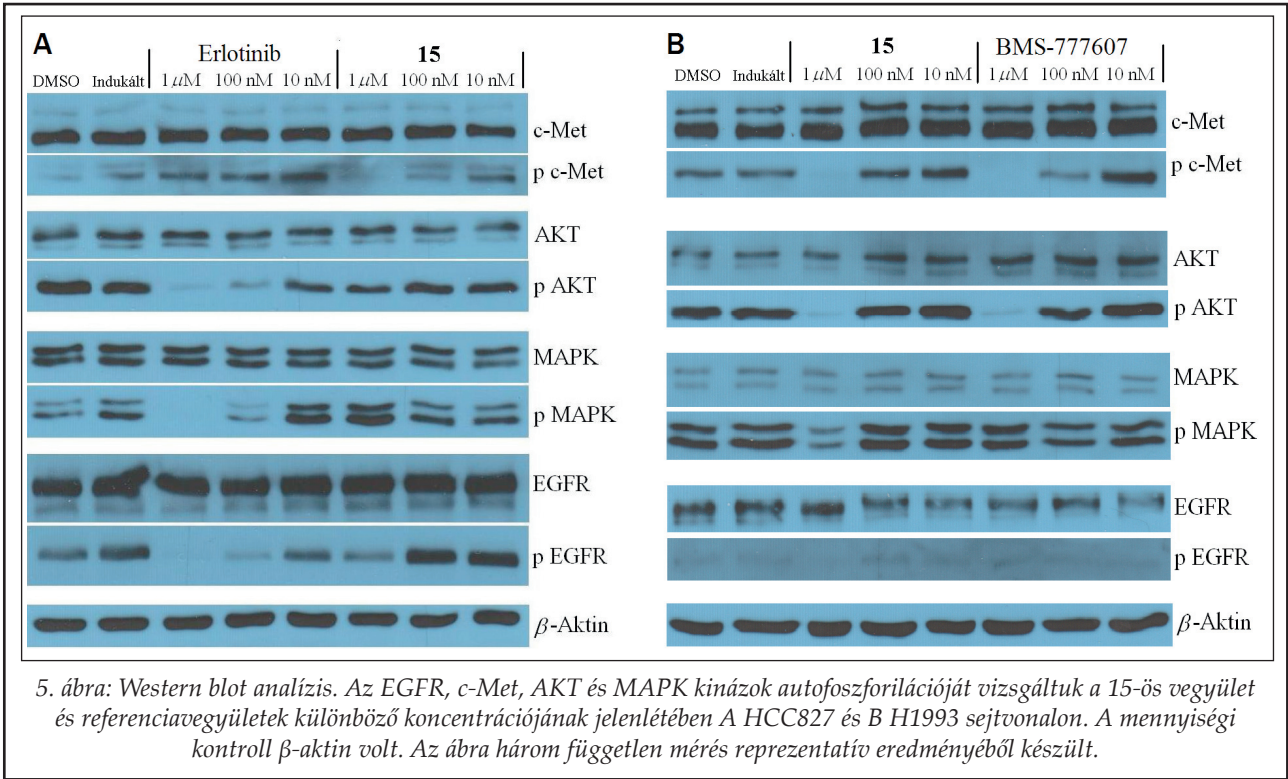
#### Western Blot analízis

Annak bizonyítására, hogy a 15 számú vegyület *in vivo* is az EGFR és a c-Met működésének gátlásán keresztül fejt ki apoptózis-indukáló hatását, western blot vizsgálatokat végeztünk. A két megcélzott receptor-kinázon (EGFR és c-Met) kívül a mindkettőből kiinduló két legfontosabb jelút (PI3K/AKT és MAPK) jól ismert tagjainak autofoszforylációját – tehát aktivitását – mértük



4. ábra: Apoptózis vizsgálat





két sejtvonalon. A HCC827 sejtvonal EGFR overexpresszáló, míg a H1973 c-Met amplifikált. Mindkettőről elmondható, hogy az említett receptor-kinázok abnormálisan magas koncentrá-

cióban vannak jelen a sejtmembránjukban, ami ligand nélküli aktivitást okoz. Ez hajtja a tumorsejt proliferációját, és valószínűleg ezért nem tapasztaltunk autofoszforiláció növekedést a citokin-

III. táblázat

A 15-ös számú anyag szelektivitási profil vizsgálata 34 klinikailag releváns kinázon

Enzim	Inhibition %	Enzim	Inhibition %
DDR1	111	MAPK-ERK1	20
AXL	109	CHK1	20
c-Kit	91	JNK1	19
ErbB2	81	JAK3	19
RET	78	AKT1	18
FLT3	76	CSK	18
ABL	48	PAK4	17
TrkA	46	FGFR3	14
TIE2	43	IRAK4	12
PDGFR-β	40	SYK	11
c-SRC	37	IKK-β	9
B-RAF	37	PAK1	9
VEGFR-2	36	ROCK 2	5
PKC	31	PIM1	-3
Aurora A	30	mTOR	-4
PLK3	30	ZIPK (DABK3)	-5
CDK4/CycD1	21	CDK2/CYCA	-5

kezelések hatására. A **15** vegyület viszont csökkentette az kinázok autofoszforilációját, de sejtvonalanként eltérő mértékben. A HCC827 esetében (**5. ábra/A**) a referencia anyagnál erősebben csökkentette a c-Met, de gyengébben az EGFR aktivitását. Összességében mégis csak a referencia anyag hatására csökkent a downstream jelút aktivitása is. A H1993 esetében (**5. ábra/B**) a referencia anyaggal majdnem megegyező mértékben gátolta a c-Met és erősebben az EGFR autofoszforilációját. Ennek eredményeképp az AKT jelutat egyformán gátolták 1  $\mu$ M koncentrációban. A MAPK jelutat viszont **15** gátolta hatékonyabban, mint a referenciaanyag.

A Western blot-os mérések tehát alátámasztották, amit az előzetes mérések alapján már sejtettünk: a **15** vegyület hatékonyabban gátolja a c-Met kinázt, mint az EGFR-t, és míg az erlotinib nagyságrendekkel hatékonyabb **15**-nél HCC827 sejtvonalon, addig H1993-on egyforma erős a hatásuk (a BMS-777607-el is).

#### Szelektivitás vizsgálat

A hatásspektrum feltérképezése miatt a leghatékonyabb vegyületet egy klinikailag releváns 34 kinázt tartalmazó szelektivitási panelen is vizsgáltattuk (Proteros Biostructure GmbH) 1  $\mu$ M koncentrációban, 3 párhuzamos mérés keretében. A vegyületcsalád a c-Met és EGFR kinázok mellett a DDR1 (111%), AXL (109%), c-Kit (91%), ErbB2 (81%), RET (78%) és FLT3 (76%) kinázokat gátolta 50%-nál nagyobb mértékben. (**III. táblázat**)

#### Diszkusszió és következtetések

Az EGFR kináz család több mint 10 éve ismert célpontja a nem-kissejtes tüdőcarcinómának (NSCLC), azonban a klinikai alkalmazás során használt EGFR gátlók a rezisztens tumorok egy csoportja ellen hatástalanoknak bizonyultak. A rezisztencia egyik okozója a c-Met amplifikáció megjelenése a tumorsejtekben. Annak ellenére, hogy számos szelektív c-Met és EGFR gátló van klinikai vizsgálat alatt még nem ismert olyan vegyületcsalád, amelyik a két kinázt egyidőben, szubmikromolárisan gátolja. A c-Met/EGFR közös gátlók fejlesztését jelentősen megnehezíti, hogy a két kináz filogenetikailag nem rokon és katalitikus doménjük szekvenciája is jelentősen eltérő.

Kutatásunk során a racionális hatóanyag tervezés eszközeit használva hatékony c-Met/EGFR gátló vegyületek fejlesztését és a talált hitvegyüle-

tek optimalizálását tűztük ki célul. Az elsődleges *screening* alapján kiválasztott vegyületek *in silico* módosítása majd tesztelése során jutottunk el azokhoz a származékokhoz, melyek enzimés eszszékben is hatékonyak bizonyultak. A szintetizált vegyületek szerkezet-hatás összefüggés (SAR – structure-activity relationship) vizsgálata során találtuk a leghatékonyabb **15** 3-tienil származékot és összesen 3 vegyületet (**13**, **14** és **15**) választottunk ki a további *in vivo* vizsgálatokra. A viabilitási vizsgálatok során a kiválasztott vegyületeket HCC827, A549, H1975, H1993 sejtvonalakon vizsgáltuk, valamint western blot vizsgálattal igazoltuk, hogy a **15** vegyület élő sejtekben is gátolja a foszforilációt mindkét kináz esetében, míg közeli származékai nem mutattak efféle hatást. A Western blot analízissel igazoltuk, hogy a vegyület az ERK mediálta MAPK és az PI3K/AKT/mTOR jelutak egyes kinázainak is csökkentette az autofoszforilációját.

Az általunk fejlesztett vegyületek ATP-kompetíció vizsgálatát is elvégeztük és arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek a vegyületek a reverzibilis, ATP-kompetitív, gátló vegyületek közé tartoznak. A vegyületcsalád szelektivitásának vizsgálata céljából 34 klinikailag releváns kinázt tartalmazó ún. szelektivitási panelen is vizsgáltuk a leghatékonyabbnak talált származékot. A két kinázzal szerkezetileg rokon kinázokon (c-Met vs. AXL illetve EGFR vs. ErbB2) szintén potenciális gátlást találtunk. A **15** vegyület a jelenleg ismert leghatékonyabb c-Met/EGFR gátló multi-kináz inhibitor, amely enzimés és sejtes vizsgálatokban is gátolja az EGFR és c-Met autofoszforilációját. Az eredményeket figyelembe véve a vegyületcsalád alkalmas arra, hogy még hatékonyabb EGFR/c-Met kettősgátlók fejlesztésének kiindulási molekulája legyen.

#### Köszönetnyilvánítás

A kutatási eredmények az NKFP\_07\_A2-NANODRUG pályázat támogatásával születtek. Szeretnénk köszönetet mondani Dr. Lars Neumannnak az enzimés szelektivitási vizsgálatok elvégzéséért és Dr. Dancsó Andrásnak (EGIS Nyrt., Budapest, Magyarország) a modellezésben nyújtott szakmai segítségéért.

#### IRODALOM

1. Roengvoraphoj, M., Tsongalis, G.J., Dragnev, K.H., Rigas, J.R.: Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small

- cell lung cancer: Focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients. *Cancer Treatment Reviews*, 2013
2. Sgambato, A., Casaluca, F., Maione, P., Rossi, A., Rossi, E., Napolitano, A., Palazzolo, G., Bareschino, M.A., Schettino, C., Sacco, P.C., Ciadiello, F., Gridelli, C.: The role of EGFR tyrosine kinase inhibitors in the first-line treatment of advanced non small cell lung cancer patients harboring EGFR mutation. *Curr Med Chem*. 2012
  3. Bonanno, L., Jirillo, A., Favaretto, A.: Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and new therapeutic perspectives in non small cell lung cancer. *Curr Drug Targets*. 2011
  4. Lynch, T.J., Adjei, A.A., Bunn, P.A. Jr, Eisen, T.G., Engelman, J., Goss, G.D., Haber, D.A., Heymach, J.V., Jänne, P.A., Johnson, B.E., Johnson, D.H., Lilenbaum, R.C., Meyerson, M., Sandler, A.B., Sequist, L.V., Settleman, J., Wong, K.K., Hart, C.S.: Summary statement: novel agents in the treatment of lung cancer: advances in epidermal growth factor receptor-targeted agents. *Clin. Cancer Res*. 2006
  5. Sordella, R., Bell, D.W., Haber, D.A., Settleman, J.: Gefitinib sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2004
  6. Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M.J., Sellers, W.R., Johnson, B.E., Meyerson, M.: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004.
  7. Warren CM, Landgraf R.: Cell Signal.Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. 2006.
  8. Stella, M.C., Comoglio, P.M. HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 1999.
  9. Tang, Z., Du, R., Jiang, S., Wu, C., Barkauskas, D.S., Richey, J., Molter, J., Lam, M., Flask, C., Gerson, S., Dowlati, A., Liu, L., Lee, Z., Halmos, B., Wang, Y., Kern, J.A., Ma, P.C.: Dual MET-EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer. *Br J Cancer*. 2008
  10. Stabile, L.P., Rothstein, M.E., Keohavong, P., Lenzner, D., Land, S.R., Gaither-Davis, A.L., Kim, K.J., Kaminski, N., Siegfried, J.M.: Targeting of Both the c-Met and EGFR Pathways Results in Additive Inhibition of Lung Tumorigenesis in Transgenic Mice. *Cancers (Basel)*. 2010
  11. Xu, H., Stabile, L.P., Gubish, C.T., Gooding, W.E., Grandis, J.R., Siegfried, J.M.: Dual blockade of EGFR and c-Met abrogates redundant signaling and proliferation in head and neck carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2011
  12. Takeuchi, S., Wang, W., Li, Q., Yamada, T., Kita, K., Donev, I.S., Nakamura, T., Matsumoto, K., Shimizu, E., Nishioka, Y., Sone, S., Nakagawa, T., Uenaka, T., Yano, S.: Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer. *Am J Pathol*. 2012
  13. Chen, H.J., Jiang, Y.L., Lin, C.M., Tsai, S.C., Peng, S.F., Fushiya, S., Hour, M.J., Yang, J.S.: Dual inhibition of EGFR and c-Met kinase activation by MJ-56 reduces metastasis of HT29 human colorectal cancer cells. *Int J Oncol*. 2013
  14. Varkondi, E., Schäfer, E., Bökönyi, G., Gyökeres, T., Orfi, L., Petak, I., Pap, A., Szokoloczi, O., Keri, G., Schwab, R.: Comparison of ELISA-based tyrosine kinase assays for screening EGFR inhibitors. *J Recept Signal Transduct Res*. 2005
  15. Timofeevski, S.L., McTigue, M.A., Ryan, K., Cui, J., Zou, H.Y., Zhu, J.X., Chau, F., Alton, G., Karlicek, S., Christensen, J.G., Murray, B.W.: Enzymatic characterization of c-Met receptor tyrosine kinase oncogenic mutants and kinetic studies with aminopyridine and triazolo-pyrazine inhibitors. *Biochemistry* 2009
  16. Schroeder, G.M., An Y, Cai Z.W., Chen X.T., Clark C, Cornelius L.A., Dai J, Gullo-Brown J, Gupta A, Henley B, Hunt J.T., Jeyaseelan R, Kamath A, Kim K, Lippy J, Lombardo L.J., Manne V, Oppenheimer S, Sack J.S., Schmidt R.J., Shen G, Stefanski K, Tokarski J.S., Trainor G.L., Wautlet B.S., Wei D, Williams D.K., Zhang Y, Zhang Y, Fargnoli J, Borzilleri R. M.: Discovery of N-(4- (2-amino-3-chloropyridin-4-yloxy)-3-fluorophenyl)-4-ethoxy-1-(4- fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (BMS- 777607), a selective and orally efficacious inhibitor of the Met kinase superfamily. *J. Med. Chem*. 2009
  17. Moyer, J.D., Barbacci, E.G., Iwata, K.K., Arnold, L., Boman, B., Cunningham, A., DiOrio, C., Doty, J., Morin, M.J., Moyer, M.P., Neveu, M., Pollack, V.A., Pustilnik, L.R., Reynolds, M.M., Sloan, D., Theleman, A., Miller, P.: Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358 774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res*. 1997
  18. Reid, A., Vidal, L., Shaw, H., de Bono, J.: Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu). *Eur. J. Cancer* 2007
  19. Mulvihill, M.J. Cooke, A., Rosenfeld-Franklin, M., Buck, E., Foreman, K., Landfair, D., O'Connor, M., Pirritt, C., Sun, Y., Yao, Y., Arnold, L.D., Gibson, N.W., Ji, Q.S.: Discovery of OSI-906: a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor. *Future Med. Chem*. 2009

## Multipartikuláris gyógyszerhordozó rendszer formulálása tablettába préselt pelletek alkalmazásával

CSOBÁN ZSOMBOR, KÁLLAI NIKOLETT, POLGÁR ÁDÁM, ANTAL ISTVÁN

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Intézet, 1092 Budapest, Hőgyes Endre utca 7-9.  
Levelezési cím: antal.istvan@pharma.semmelweis-univ.hu

### Summary

Csobán, Z., Kállai, N., Polgár, Á., Antal, I.: **Formulation of multiparticulate drug delivery systems by compressing pellets into tablets**

The use of multiparticulate drug delivery systems can contribute to more efficient and safe therapy while stability and incompatibility problems can be avoided as well.

The aim of the present work was to review the possible ways of production of pellets containing multiparticulate units and studying the most important factors influencing the product quality attributes after tablet compression.

The relationship between the formulation variables (compression pressures, different amounts of tableting excipients) and the dissolution profile of the gastroresistant coated beads were investigated.

**Keywords:** multiparticulate systems, compression of pellets, modified release, dissolution profile

### Összefoglaló

Többegységes vagy multipartikuláris gyógyszerkészítmények alkalmazásával lehetőség nyílik a gyógyszeres terápia hatékonyabbá és biztonságosabbá tételére, valamint gyógyszer technológiai inkompatibilitások illetve stabilitási problémák elkerülésére.

Jelen tanulmányunkban áttekintjük a pelletek tablettába préselésével kialakított többegységes rendszerek fejlesztésének lehetőségeit, illetve azokat a tényezőket, melyek döntően befolyásolják az előállított készítmény minőségi jellemzőit.

Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy a tablettázás során milyen mértékben változik meg a gasztrorezisztens bevonattal ellátott pelletek kioldódási profilja különböző préselő, illetve különböző mennyiségű tablettázási segédanyag felhasználása mellett.

**Kulcsszavak:** többegységes rendszerek, pelletek préselhetősége, módosított hatóanyag leadás, kioldódási profil

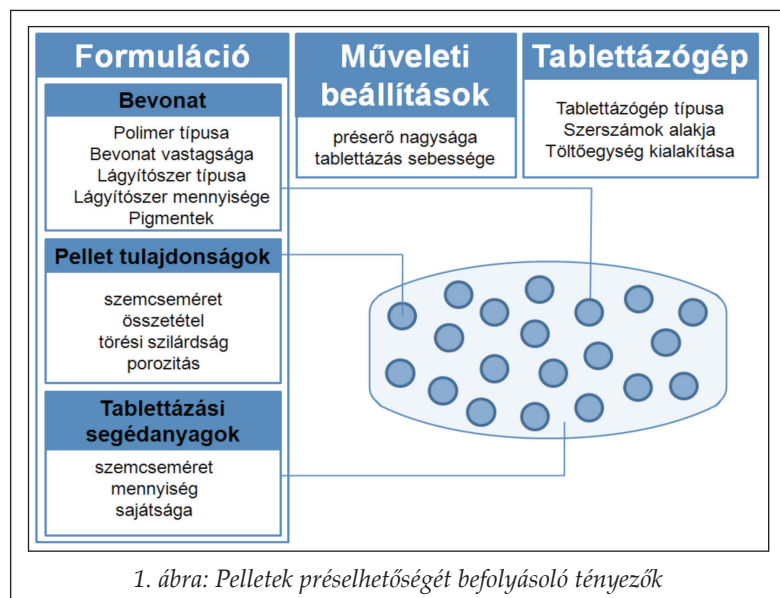
### 1. Bevezetés

A hatóanyagot tartalmazó gyógyszeres pelletek egyszerű és biztonságos adagolásához szükséges egy megfelelő adagolási egység létrehozása. A mátrix vagy rétegzett szerkezetű pelletből különböző többegységes rendszer (*Multiple unit pellet system* – MUPS) alakítható ki, amely számos fiziológias, terápiás és nem utolsósorban gyógyszer technológiai előnnyel rendelkezik az úgynevezett egységleges gyógyszerformákkal szemben [1, 2, 3]. A gyógyszeriparban elterjedt módszernek számít a szemcsék kapszulába töltése vagy különböző segédanyagokkal együtt a tablettaalak kialakítása préseléssel. A tabletták előállítása költséghatékonyság szempontjából előnyösebb a kapszulatöltésnél, illetve a kész tabletták utólagosan nehezebben manipulálhatóak a kapszuláknál. Megfelelően kialakított préselmények esetén a tablettá felezhetősége további előnyt jelent [4], ugyanakkor számos tényezőt figyelembe kell venni a pelleteket tartalmazó tablettá előállításánál (1. ábra). A tablettaalak

egyéb segédanyagok felhasználása mellett kialakítható bevont és bevonatlan mátrix szerkezetű és rétegzett típusú pelletekből, illetve a fentebb említett részecskék kombinációjából is. A legtöbb esetben a préseléssel előállított többegységes pellet-rendszerrel a tablettázás lépése csupán a tablettaalak létrehozásához szükséges. A préselés során a pelleteknek meg kell tartaniuk a tablettán belül az integritásukat, továbbá fontos, hogy a tablettázás hatására a partikulumokból történő hatóanyag-leadási profil nagymértékben ne változzon. Ennek alapvető követelménye, hogy mind a pelletnek, mind az esetlegesen pellet felületén kialakított hatóanyag rétegnek illetve filmbevonatnak épen szükséges megőriznie tulajdonságait a tablettázás során fellépő préselő ellenére.

A MUPS készítmények természetesen nemcsak az őket felépítő partikulumok alapján csoportosíthatóak, hanem az alapján is, hogy a tablettázás során felhasznált segédanyagok miként befolyásolják az egész rendszert, vagyis a tablettá szétesését és ennek megfelelően a hatóanyag-leadást. Alap-





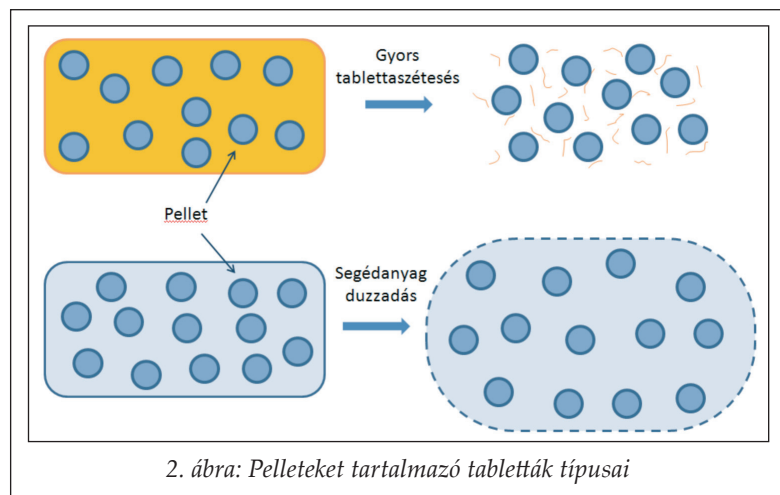
vetően három különböző típusról számol be a szakirodalom [5]. A MUPS a tablettázáshoz felhasznált segédanyagok következtében gyorsan szétesik (2. ábra). A tableta dezintegrációja történhet a szájjüregben, abban az esetben, ha a hatóanyagot hordozó partikulumok ízfedő bevonattal vannak ellátva. Például a külföldön forgalomban levő lansoprazol tartalmú orodiszperz Prevacid SoluTab (Takeda) nevű készítmény tartozik ehhez a csoporthoz. A MUPS szétesésének másik megoldása, amikor a készítmény viszonylag gyorsan szétesik, azonban a dezintegráció a gasztrointesztinális traktus szájjüregét követő területén történik, a nyelést követően. Erre példa az omeprazol tartalmú Losec MUPS (Astra Zeneca). A két típus között a szétesés helyében van a nagy különbség, amely következménye, hogy az első esetben a beteg a részecskéket nyeli le, míg a második esetben a teljes tablettát. Megemlítendő, hogy az első esetben a nyelési rendellenességgel küszködő be-

tegek, idősek, kisgyermek együttműködése javítható. A harmadik megoldás a MUPS formulálásánál, amikor a készítmény fejlesztője vagy gyártója olyan segédanyagokat alkalmaz a tabletták készítéséhez, amelyek nem teszik lehetővé a gyors szétesést. Folyadék hatására ezek a segédanyagok duzzadnak – amit a 2. ábra is szemléltet – vagy lassan erodálódnak, akadályozva a pelletekre való szétesését a tablettának. A Toprol XL (Astra Zeneca) nevű készítményt lehet példaként említeni.

Egy préseléssel előállított pellet alapú multipartikuláris rendszer tulajdonságait tehát sok tényező befolyásolja, amelyeket figyelembe kell venni a tervezés és később a gyártás során is a kívánt minőség elérésének érdekében. Jelen tanulmány áttekintést ad a pelletek préselése során felmerülő gyógyszer technológiai problémákról, megoldásokról.

## 2. A pellet tulajdonságainak jelentősége a tablettázás során

A pelletek szemcsésítéssel előállított hatóanyag-tartalmú egységek gyógyszerkészítmények gyártásában. Csaknem tökéletes gömb alakkal rendelkeznek, szerkezetük tömör, felületük egyenletes és sima. Szemcseméret-eloszlásuk homogén, szűk tartományba sorolható. A gyógyszeriparban általában alkalmazott pelletek mérete 0,5 és 1,5 mm közötti [6]. A részecskék keménysége, illetve porozitása, mérete, valamint összetétele fontos tényezőként említhetőek mind a tabletták kialakításának, mind a pelletek integritásának megőrzése szempontjából.



### 1.1. Pelletek összetétele, pelletelési segédanyagok

A tablettázandó pelleteknek kettős követelménynek kell megfelelni. Elegendhetlen a részecske bizonyos fokú rugalmassága, mely a préselés során segíti mind a pellet szerkezetének, mind az esetleges bevonat integritásának megőrzését. A megfelelő szilárdságú tabletták előállításához ezzel szemben szükséges a pellet plasztikus deformációs és fragmentációs tulajdonsága is, ami a préselés során lehetőséget

biztosít az interpartikuláris kötések kialakítására [4]. A pelletézési segédanyagok kiválasztása során azonban figyelembe kell venni a segédanyagok viselkedését mind a pelletézési eljárás, mind pedig a későbbi préselés folyamán. A kis szemcseméretű, por finomságnak megfelelő mikrokristályos cellulóz (MCC) ismert kiváló préselhetőségéről, gyakran alkalmazzák közvetlen préseléshez is. Alacsony préserő hatására is megfelelő szilárdságú tabletták készíthetők felhasználásával. Pelletézési eljárásokhoz használt segédanyagok közül *Dukic-Ott* [7] indokoltan nevezi „golden standard”-nek, ezt a cellulóz származékot, hiszen az MCC alapú pelletek nagy hozamban előállíthatók, a szemcsék jó szfericitással, alacsony friabilitás értékkel, sima felszínnel jellemezhetők [8]. Ezen ismeretek tudatában meglepőnek tűnhet, de kizárólag mikrokristályos cellulózból készült pelletek préselésével nem alakítható ki megfelelő mechanikai szilárdságú tabletták. Szakirodalomban ismert, hogy az MCC és laktóz, valamint MCC és dikalcium-foszfát keverékéből előállított pelletek jobban tablettázhatóak, mint a csupán MCC-t tartalmazó pellet. Ennek oka valószínűleg a laktóz, illetve a dikalcium-foszfát fragmentációt elősegítő tulajdonsága [9; 10]. Általánosságban elmondható, hogy az alapanyagkeverék összetételének megfelelő megválasztásával lehetséges jól tablettázható pelletek előállítása, azonban mindig figyelembe kell venni, hogy a porok és a pelletek préselés során eltérően viselkednek, azonos összetétel esetén is.

### 1.2. Pelleték szemcseméretének szerepe

Préselés során az alkalmazott pelletek mérete jelentősen befolyásolja az előállított tabletták tulajdonságait. A megfelelő részecskeméret alkalmazása különösen fontos módosított hatóanyag-leadású pelletek tablettázása esetén. *Bechard* és *Leroux* kísérleteikben etil-cellulóz alapú bevonattal ellátott, különböző átmérőjű pelletek hatóanyag leadásának változását vizsgálták préselés hatására. Az általuk alkalmazott pelletek 250-420  $\mu\text{m}$ , 420-590  $\mu\text{m}$ , illetve a 590-840  $\mu\text{m}$  mérettartományba estek. Eredményeik szerint a kisebb pelletek érzékenyebbek voltak a préselésre, míg a nagyobbak megtartották a kiindulási, préselés mentes kioldódási profiljukat. A jelenség a pelletek összfelületkülönbségével és a filmbevonat vastagságával magyarázható. A kisebb részecskék nagyobb összfelülettel, így vékonyabb bevonattal, míg a nagyobbak kisebb összfelülettel és vastagabb bevonattal rendelkeztek. Feltételezhetően a vastagabb

bevonat miatt voltak a nagyobb részecskék kevésbé érzékenyek a préselés során fellépő erőhatásokra [11]. *Ragnarson* és munkatársai vizsgálataik során ezzel szemben a kis méretű pelletek használatát találták előnyösnek. Kísérleteikben 440  $\mu\text{m}$ , 540  $\mu\text{m}$ , 850  $\mu\text{m}$  átmérőjű bevont pelleteket tablettáztak. Az *in vitro* kioldódási vizsgálatok alapján azt állapították meg, hogy a kisebb méretű pelletek tudták jobban megőrizni az eredeti kioldódási tulajdonságaikat [12].

### 1.3. Pelleték keménységének, porozitásának hatása

A pelletszemcsék összetételén és méretén túl a tablettázhatóság szempontjából fontos szerepe van a partikulumok porozitásának és törési szilárdságának is. *Johansson* és munkatársai mutattak rá a porozitás jelentőségére préselés során [13]. Kísérleteikben extrúziós-szferonizációs eljárással előállított MCC alapú pelleteket használtak. Granuláló-folyadékként különböző összetételű etanol-víz elegyeket alkalmaztak, a növekvő etanol arány nagyobb porozitású pelleteket eredményezett. Eltérő porozitású pelleteket állítottak elő, majd préseltek tablettává. A préselmények törési felületéről készített pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken láthatóvá vált, hogy a préselést követően a pelletek közelítőleg megőrizték eredeti alakjukat, tehát jellemzően plasztikusan deformálódtak, míg a fragmentáció szerepe kisebb volt. Azonos préserő alkalmazása mellett a növekvő pellet porozitás a préselés során térfogatváltozást, illetve keményebb tablettákat eredményezett. A jelenség háttere, hogy a porozitás növelése elősegíti a plasztikus deformációt, tehát erősebb interpartikuláris kötések létrejöttének kedvez. Bár a porozitás bizonyos határon belüli növelése előnyös a préselhetőség szempontjából, a túl magas porozitás a pelletek töréséhez és az eredeti előnyös tulajdonságok elvesztéséhez vezethet. Erre utal *Johansson* és munkatársainak későbbi megfigyelése is. A túl magas porozitású pelletek használatakor a pelleteknek nincs ellenállása a préserővel szemben, ennek következtében a törési felület áthalad a pelleteken, míg az alacsonyabb porozitású részecskéket tartalmazó tabletták a pelletek felszínén repednek [14].

*Milli* és munkatársai szintén pelleték porozitását tanulmányozták a víz/etanol összetételű granuláló folyadék esetén [15]. *Beckert* és munkatársai [16] különböző segédanyagokat tartalmazó, különböző törési szilárdsággal jellemezhető Eudragit® L 30D 55-tel bevont pelleteket préseltek. Abban az esetben, amikor a bevonás előtt és után a

pellet elasztikus tulajdonsága jelentős mértékben nem változott, a préselést követően a bevont pelletéken minimális károsodást figyeltek meg. Megállapították, hogy a magasabb törési szilárdsággal jellemezhető, keményebb pelleték sokkal jobban ellenálltak a tabletták kialakításához szükséges préselőnek, mivel kisebb mértékben deformálódtak és a filmbevonatok is kevésbé voltak érzékenyek a préselőre.

### 3. Pellet felületén kialakított bevonat tulajdonságainak jelentősége

A pelleték felületén kialakított bevonat lehetőséget ad ízfedésre, gyógyszer technológiai inkompatibilitások elkerülésére, illetve módosított hatóanyag-leadású gyógyszerforma előállítására. A különböző kémiai szerkezetű polimer bevonatokkal szemben fontos követelmény, hogy ne sérüljenek, illetve megtartsák eredeti funkciójukat a bevont pelleték tablettázása után is. A bevonat anyagi minősége, az alkalmazott bevonószer mennyisége, vagy az esetlegesen jelenlévő lágyítószer nagymértékben befolyásolja a préselés során a bevonat ellenálló-képességét, így a létrehozott többegységes gyógyszerhordozó rendszer funkcionalitását.

#### 3.1. Filmképző polimerek típusának, mennyiségének szerepe

Dashevsky és munkatársai etil-cellulózzal (Aquacoat® ECD - FMC Biopolymer, Philadelphia, PA, USA) illetve polivinil-acetáttal (PVA, Kollicoat® SR – BASF, Ludwigshafen, Németország) bevont hatóanyagot tartalmazó, nyújtott hatóanyag-leadású pelletékből készítettek préselményeket [17]. Megállapították, hogy a Kollicoat® SR trietil-citrát lágyítószer használva alkalmasabb, abban az esetben, ha a pelletéket tablettázni kell a következő technológiai lépésben. A filmbevonatok mechanikai ellenállóképessége növekszik a bevonatréteg átmérőjének növelésével, de a túl vastag bevonatréteg a préselés során az alegységek fúziójához, mátrix szerkezet kialakulásához vezet. Ennek következtében az adagolási formára nem érvényesülnek a multipartikuláris rendszer előnyei.

Chang és Rudnic kísérleteikben etil-cellulóz vizes diszperziójával, valamint szerves etil-cellulóz oldattal bevont részecskéket hasonlítottak össze [18]. Eredményeik azt mutatták, hogy az utóbbi esetben a préselésnek jobban ellenálló bevonat jött létre, de az eljárás nagy mennyiségű szerves oldószer hasz-

nalatát igényli. Béchard és Leroux az etil-cellulóz bevonat utókezelésével próbálták javítani a bevonat mechanikai tulajdonságait [11]. Elméletük szerint a vizes diszperzió porlasztásával előállított bevonat nem teljesen egyenletes, ami azonban javítható a bevont pelleték filmképzési hőmérséklet fölötti hőfokon való kezelésével (curing). Az akril alapú bevonatok (Eudragit® bevonat család) rugalmasabbak, nagyobb flexibilitással rendelkeznek a cellulóz polimereknél. Ennek magyarázata, hogy az akril-észter láncmolekulák között gyenge másodrendű kötések hatnak, míg a cellulóz származékok esetén erősebb hidrogén-kötések kialakulására van lehetőség. Több kutatócsoport eredményei bizonyítják, hogy Eudragit® NE, Eudragit® RL, illetve Eudragit® RS típusú polimer diszperziókkal bevont pelleték a tablettázást követően is megőrizték eredeti hatóanyag-leadási tulajdonságaikat. Az elvégzett kioldódás-vizsgálatok szerint csak kismértékű volt az eltérés a préselt és a kiindulási bevont pelleték között, tehát ezek a segédanyagok alkalmasak tabletták gyógyszerformájú, többegységes, módosított hatóanyag-leadású rendszerek formulálására [19, 20]. Természetesen akril polimer bevonattal ellátott pelleték esetén sem növelhető tetszőleges mértékben a tablettázás során alkalmazott préselő. Flament és munkatársainak eredményei szerint Eudragit® NE filmbevonatú pelleték esetén 10-15 kN préselővel lehetséges volt sima felszínű tabletták előállítása, 20 kN préselő fölött viszont már csökkent a bevonat funkciója, mely azonban nem a filmréteg törésének, hanem a nyúlásnak és elvékonyodásnak volt következménye [21]. Altaf és munkatársai polimer bevonatú (Aquacoat®) acetaminofen tartalmú többretegű pelletéket készítettek. Tablettázási segédanyagokként mannitol és MCC keverékét alkalmazták [22, 23]. Ennek a koncepciónak az ötletét az adta, hogy a többretegű pelleték tablettába préselése során a pellet külsőbb bevonat rétegei elnyelnék a préselő egy részét és törésükkel biztosítanak az azonnali hatóanyag-fel szabadulást, miközben a belsőbb filmrétegeket megvédenek a töréstől és ezáltal biztosítanak a nyújtott hatóanyag-leadást. Eredményeik alapján megállapítható, hogy feltevésük helyesnek bizonyult.

#### 3.2. Filmbevonás során alkalmazott lágyítószer szerepe

A bevonás során használt polimer diszperzió lágyítószereket is tartalmazhat. A lágyítószer alkalmazásának elsődleges célja a bevonó polimer

minimális filmképzési hőmérsékletének csökkentése, azaz lehetővé teszik a bevonás elvégzését alacsonyabb hőmérsékleten is. A lágyítószer gyakran előnyösen befolyásolja a filmbevonat mechanikai tulajdonságait, fokozzák annak elaszticitását, így növelik a bevonat ellenálló-képességét a préselésnél fellépő hatásokkal szemben. *Dashevsky* és munkatársai a fentebb már említett publikációjukban a lágyítószer hatását is vizsgálták [17]. A trietil-citrát alkalmazása PVA polimer használata esetén nagymértékben segítette a bevonat 'sérülésmentes' préselhetőségét.

#### 4. Tablettaalak kialakításához szükséges segédanyagok szerepe

A pelleték önmagukban nem tablettázhatóak olyan módon, hogy a részecskék integritása megmaradjon, ugyanakkor nagy szilárdságú tabletták jöjjen létre. A pelletékhez adott megfelelő minőségű és mennyiségű tablettázási segédanyag alkalmazásával nyílik lehetőség a multipartikuláris adagolási egység előállítására. A tablettázási segédanyagoknak számos feltételt kell teljesíteniük. Fontos szerepük van a pelleték integritásának megőrzésében, illetve a részecskék közvetlen érintkezésének és a bevonatok fúziójának megakadályozásában. Lényeges, hogy a megfelelő segédanyagok homogén keveréke alacsony préserő hatására is nagy szilárdságú tablettát eredményezzen, mert a préserő növelése minden esetben az alegységek károsodásához vezet. További elvárás, hogy az alkalmazott segédanyagok ne befolyásolják a hatóanyag kioldódását, vagy a kioldódásra gyakorolt hatásuk kiszámítható legyen [4]. Alapvetően fontos a szegregáció elkerülése, ennek érdekében egyes kutatók azokat a töltőanyagokat ajánlják, amelyek részecskemérete közel azonos az alkalmazott pelleték méretével [24, 25, 26, 27]. Mások arról számoltak be, hogy csökken a szegregációs veszély, ha kis részecskeméretű

MCC-t használnak [28, 29]. *Wagner* és munkatársai [30] bevonattal ellátott (Eudragit® FS 30 D) pelletet préseltek, segédanyagként pedig MCC port vagy granulátumot használtak. Úgy találták, hogy a préselményből történő hatóanyag-leadást jobban befolyásolta a por szemcsemérettel rendelkező MCC, mintha granulátumként használták volna a mikrokristályos cellulózt a tablettázás során. A por szemcsemérettel rendelkező tablettázási segédanyag használatát inkább a kevésbé rugalmas polimerbevonatokkal rendelkező pelleték préselésénél javasolták.

#### 5. Kísérleti rész. Gasztrorezisztens filmbevonatú pelleték préselhetőségének vizsgálata

##### 5.1. Anyagok, gyógyszer technológiai eljárás

Koffein (Hungaropharma ZRt., Budapest, Magyarország) tartalmú réteg kialakítása 500-710 µm méretű mikrokristályos cellulózból készült inert pelletmagok (MCC; Ethispheres® 600; NPP Pharm Ltd, Franciaország) felületén hidroxipropil-metil-cellulóz (*Pharmacoat*® 606; *Shin-Etsu Chemical Ltd, Japán*), mint kötőanyag, és Sunset Yellow FCF (Sensient Food Colors UK Ltd, Egyesült Királyság), mint színezőanyag felhasználásával fluidizációs-eljárással történt Aeromatic STREA-I. (Aeromatic-Fielder AG, Svájc) laboratóriumi fluidizációs készülékben. A hatóanyagot tartalmazó pelleték felületén a gasztrorezisztens Eudragit® L filmbevonat (Evonik Industries AG, Darmstadt, Németország) kialakítása szintén a fent említett készülékben alsó porlasztással történt. A filmbevonáshoz alkalmazott diszperzió összetételében lágyítószerként trietil-citrát (Fluka Chemie AG, Svájc), antiadhéziós anyagként mikronizált talkum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Németország) szerepelt. A hatóanyaggal történő rétegzés és a filmbevonás műveletének paramétereit az **I. táblázat** szemlél-

I. táblázat

Fluidizációs eljárások beállítási paramétereit

Gyártási paraméter	Hatóanyag rétegzés	Filmbevonás
Töltet tömeg (g)	200	150
Fúvóka átmérő (mm)	0,8	0,8
Belépő levegő hőmérséklet (°C)	50	45
Kilépő levegő hőmérséklet (°C)	37-40	31-34
Porlasztó levegő nyomása (bar)	1	1
Fluid levegő áramlási sebessége (m³/óra)	80-130	80
Adagolási sebesség (g/perc)	5-6	4-5
Száritás hőmérséklete (°C)	50	45
Száritás ideje (perc)	10	10



II. táblázat

Kétváltozós, háromszintű faktoriális kísérleti terv MUPS előállítására

Szintek	Aktuális értékek	
	$x_1$ : MCC mennyisége (mg)	$x_2$ : Tabletta törési szilárdága (N)
-1	300	40-50
0	450	90-100
+1	600	140-150

Előállított tabletták kódja	MCC mennyiségének megfelelő szint ( $x_1$ )	Tabletta törési szilárdágának megfelelő szint ( $x_2$ )
300 mg/40-50 N	-1	-1
300 mg/90-100 N	-1	0
300 mg/140-150 N	-1	1
450 mg/40-50 N	0	-1
450 mg/90-100 N	0	0
450 mg/140-150 N	0	1
600 mg/40-50 N	1	-1
600 mg/90-100 N	1	0
600 mg/140-150 N	1	1

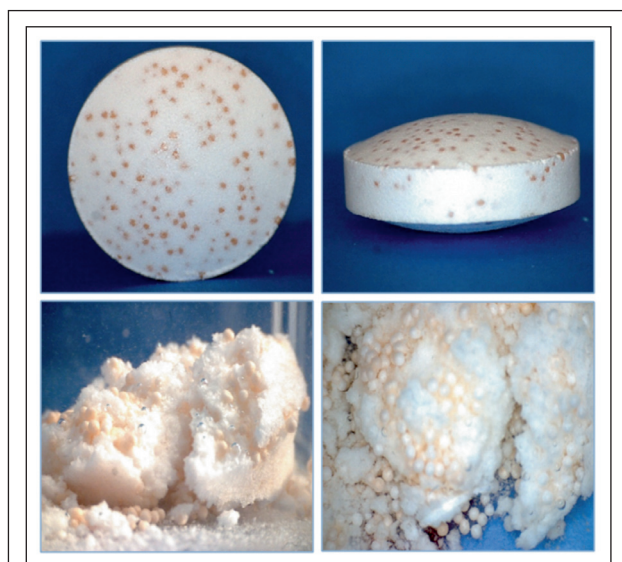
teti. A tablettázás során előállított préselvények az **II. táblázatban** bemutatott  $3^2$  kísérletterv szerint készültek. A 10 m/m %-os filmbevonattal rendelkező koffein tartalmú pelletek préselhetőségének vizsgálatához minden esetben 300 mg pelletet használtunk. Az analitikai pontossággal (Sartorius BL 310 típusú analitikai mérleg, Sartorius AG, Németország) kimért pelleteket 300 mg vagy 450 mg illetve 600 mg MCC (Vivapur® 102, JRS Pharma, Németország) töltőanyaggal homogenizáltuk, majd excenteres tablettázógéppel (Diaf, TM 20 típus, Koppenhága, Dánia) különböző préserők használatával 40-50 N/90-100 N/ 140-150 N törési szilárdsággal jellemezhető 15 mm átmérőjű, bikonvex alakú tablettákat állítottunk elő.

### 5.2. Vizsgáló módszerek

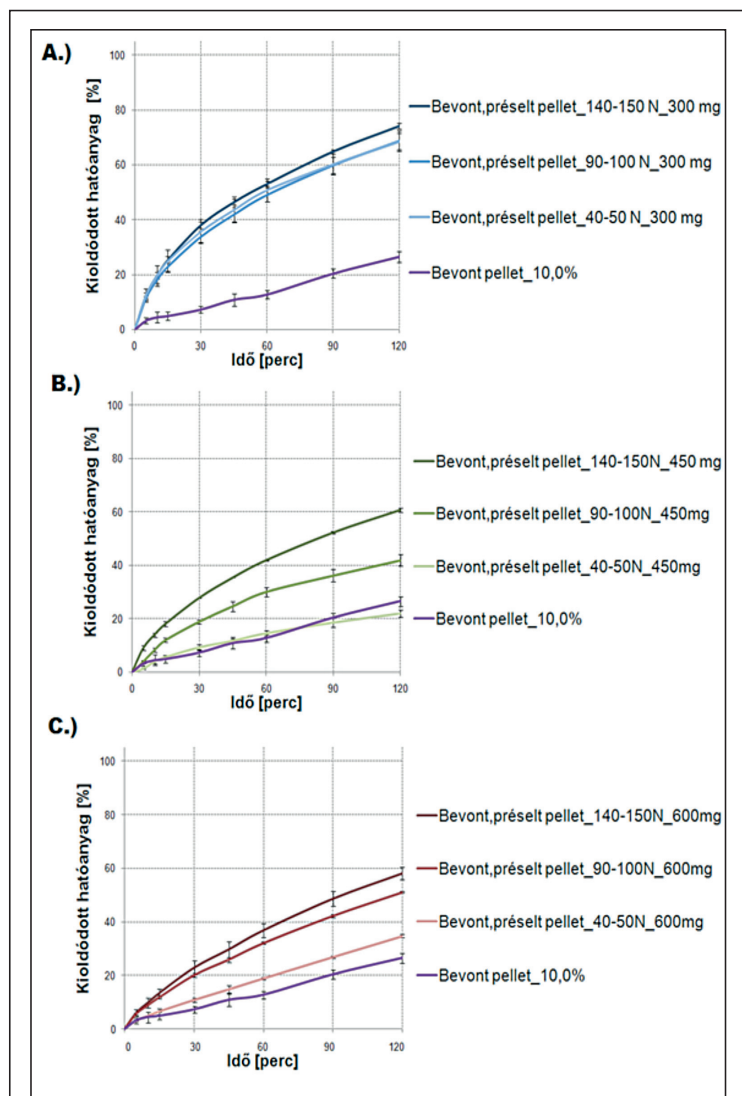
Az **II. táblázatban** megadott kísérletterv szerint készült tabletták egyedi tömegét (Sartorius BL 310 típusú analitikai mérleg, Sartorius AG, Németország), törési szilárdságát (TBH 200, Erweka instrument GmbH, Németország) meghatároztuk. A tabletták magasságát digitális tolómérő készülékkel (Mitutoyo Absolute, Mitutoyo Corp., Japán) mértük. A kioldódás vizsgálatokat Pharmatest PTW II. (Pharma Test Apparatebau AG, Hainburg, Németország) kioldódás vizsgáló fürdőben végeztük, forgókosaras módszerrel, 100 l/perc fordulatszámra. Kioldóközegként  $37 \pm 0,5$  °C temperált, 900 ml térfogatú sósav puffert (pH = 1,0) alkalmaztunk. A kioldódott hatóanyag mennyiséget UV spektrofotometriás módszerrel

Agilent 8453 (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) spektrofotométerrel 273 nm-en határoztuk meg. A statisztikai elemzés során a 120. percben mért kioldódott hatóanyag mennyisége és a tablettázásnál felhasznált MCC mennyisége, illetve a tabletták törési szilárdsága között kerestünk összefüggést. A TableCurve®3D v4.0 (Systat Software Inc., Egyesült Királyság) szoftver segítségével becsült polinomiális modell egyenlete:

$$z = a + bx + cy + dx^2 + ey^2 + fxy$$



3. ábra: Gasztrorézisztens koffeint tartalmazó pelleteket és 450 mg MCC-t tartalmazó préselvény



4. ábra: Bevonattal ellátott préselt és nem préselt pelletek kioldódási profilja a felhasznált töltőanyag mennyisége szerint. A.: 300 mg MCC felhasználásával, különböző préserővel készült tabletták hatóanyag-leadása; B.: 450 mg MCC felhasználásával, különböző préserővel készült tabletták hatóanyag-leadása; C.: 600 mg MCC felhasználásával, különböző préserővel készült tabletták hatóanyag-leadása

ahol  $x$  és  $y$ , mint független változók a faktorokat ( $x$ : MCC mennyiség,  $y$ : törési szilárdság), az együtthatók ( $b, c, d, e, f$ ) pedig a fő ( $b, c$ ), a nemlineáris kvadratikus ( $d, e$ ) és az interakciós ( $f$ ) hatásokat írják le.

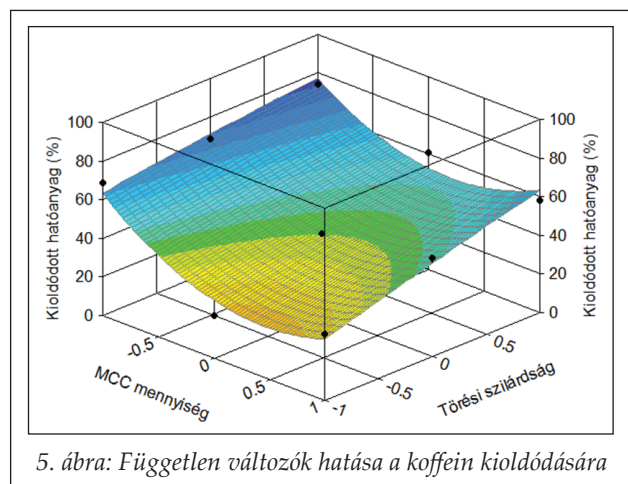
### 5.3. Eredmények

A 3. ábrán látható tabletta 750 mg átlag tömeggel és 40-50 N törési szilárdsággal jellemezhető. Vízebe helyezve nagyon gyors szétesést tapasztalhatunk, amely az MCC-nek, és az alacsony alkalmazott préserőnek köszönhető. A tabletta szétesését követően jól láthatóak a hatóanyagot tartalmazó partikulumok szabaddá válása. Az III. táblázat mutatja a 9 féle préselmény tabletta vizsgálatának eredményét. A mérési adatok alapján megállapítható, hogy a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv követelményének megfelelően az egyedi tömege a préselményeknek megfelelő, illetve, hogy a tervezett törési szilárdság értékeket minden esetben sikerült megközelíteni az alkalmazott préserő beállításával. A 9 féle multipartikuláris rendszerből és a kiindulási, nem préselt pelletekből történő hatóanyag-fel szabadulást sósavas közegben ( $\text{pH} = 1,0$ ) szemlélteti a 4. ábra. Az *in vitro* kioldódás vizsgálat eredményei jól tükrözik, hogy 300 mg MCC töltőanyag felhasználásával nem lehetett készíteni olyan tablettát, amelynek hatóanyag-leadási profilja megközelítené a kiindulási, 'préselés mentes' pellet kioldódási görbét. A 300 mg MCC felhasználásával készült tabletták függetlenül az alkalmazott préserő nagyságától (4/A. ábra) nem megfelelő koffein kioldódási

III. táblázat

Tabletta vizsgálatok eredményei ( $n=20$ ; átlag  $\pm$  SD)

Pellet mennyisége (mg)	Vivapur 102 mennyisége (mg)	Tervezett törési szilárdság (N)	Tömeg (mg)	Törési szilárdság (N)	Magasság (mm)
300	300	40-50	593,3 $\pm$ 7,12	39 $\pm$ 2,5	4,8 $\pm$ 0,03
300	300	90-100	598,1 $\pm$ 2,20	89 $\pm$ 5,2	4,5 $\pm$ 0,01
300	300	140-150	590,3 $\pm$ 4,62	137 $\pm$ 6,3	4,3 $\pm$ 0,01
300	450	40-50	736,4 $\pm$ 2,13	40 $\pm$ 2,5	6,0 $\pm$ 0,01
300	450	90-100	736,6 $\pm$ 2,41	105 $\pm$ 5,5	5,4 $\pm$ 0,01
300	450	140-150	736,5 $\pm$ 3,56	149 $\pm$ 7,3	5,1 $\pm$ 0,02
300	600	40-50	886,8 $\pm$ 2,59	42 $\pm$ 2,3	7,3 $\pm$ 0,01
300	600	90-100	886,5 $\pm$ 1,89	98 $\pm$ 4,1	6,9 $\pm$ 0,01
300	600	140-150	885,7 $\pm$ 1,68	145 $\pm$ 3,5	6,6 $\pm$ 0,01



profíllal rendelkeznek, ami arra enged következtetni, hogy a gasztrorezisztens bevonat sérült. A 300 mg-nál több, 450 mg és 600 mg töltőanyag alkalmazásával, nagyobb préserővel előállított tabletták (törési szilárdságuk: 90-100 N, és 140-150 N) már lassabb kioldódási profíllal rendelkeznek, de ezek a hatóanyag-leadási görbék is gyorsabb sebességűek, mint a 'préselés mentes' pellet kioldódási profilja, ami szintén a pelletek felületén kialakított filmbevonat sérülésére utal. Várározásainknak megfelelően az alacsonyabb préserővel készült, 450 mg és 600 mg töltőanyagot tartalmazó tabletták (törési szilárdságuk: 40-50 N) hatóanyag-leadása csökkent, és megközelítette a 'préselés mentes' pellet kioldódási görbáját. Ezekben az esetekben a pelleten levő Eudragit® bevonat nem vagy csak igen kismértékben sérült. A statisztikai vizsgálat során a felület illesztésnél kapott válaszegyenlet a következő:

$$z(\%) = 42,09 - 11,25x + 11,28y + 17,69x^2 - 0,83y^2 + 4,42xy$$

$$r = 0,955$$

Az illesztés során nyert válasz felület-függvényt az 5. ábra mutatja. A kapott egyenlet együtthatói és az ábra is szemlélteti, hogy a préseléshez használt töltőanyag mennyiségének és az alkalmazott préserőnek szintén jelentős hatása van a kioldódott hatóanyag mennyiségére. Ezt az illesztés megfelelő regressziója szintén alátámasztja. A töltőanyag mennyiségének növelése (+1) csökkenti a leadott koffein mennyiséget, ezzel ellentétben a törési szilárdság-közvetve az alkalmazott préserő növelése (+1) a kioldódott hatóanyag mennyiségének növekedését eredményezi. Ennek oka egyrészt a filmbevonat sérülése, illetve hozzájárulhat a tabletta széteséshez szükséges növekedett idő is.

## Következtetések

Multipartikuláris rendszert tartalmazó tabletta fejlesztése kihívást jelentő gyógyszer technológiai feladat. Bár számos szempontot kell figyelembe venni és több formulálási paramétert szükséges optimalizálni a munka során, a sikeres megvalósítás egyedi biofarmáciai és farmakokinetikai előnyökkel járhat és innovatív megoldáson alapuló készítményt eredményezhet.

## Köszönetnyilvánítás

A szerzők hálás köszönetüket fejezik ki az Evonik Degussa Hungária KFT-nek a bevonáshoz alkalmazott filmképző polimer diszperzióért.

## IRODALOM

- Roy, P., Shahiwala, A.: J Control Release, 134, 74-80 (2009).
- Bechgaard, H., Nielsen, G.H.: Drug Dev Ind Pharm, 4, 53-67 (1978).
- Clarke, G.M., Newton, J.M., Short, M.D.: Int. J. Pharm. 114, 1-11 (1995).
- Bodmeier, R.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 43, 1-8 (1997).
- Bhad, M.E., Abdul, S., Jaiswal, S. B., Chandewar, A.V., Jain, J.M., Sakarkar, D.M.: Int. J. Pharm. Tech. Res. 2, 847-855 (2010).
- Gajdos, B.: Pharm. Ind. 45, 1-7 (1983).
- Dukić-Ott, A., Thommes, M., Remon, J.P., Kleinebudde, P., Vervaeke, C.: Eur J Pharm Biopharm, 71, 38-46 (2009).
- Harris MR, Ghebre-Sellassie I.: Formulation Variables. In: Ghebre-Sellassie I., (szerk.) Pharmaceutical Pelletization Technology. Marcel Dekker, Inc.; New York: 1989: 145-164.
- Schwartz, J. B., Nguyen, N. H., Schnaare, R. L.: Drug Dev. Ind. Pharm. 20, 177-184 (1994).
- Wang, C., Zhang, G., Shah, N. H., Infeld, M. H., Malick, A. W., McGinity, J. W.: Drug Dev. Ind. Pharm. 21, 753-779 (1995).
- Béchar, S. R., Leroux, J. C.: Drug Dev. Ind. Pharm. 18, 1927-1944 (1992).
- Ragnarsson, G., Sandberg, A., Jonsson, U. E., Sjögren, J.: Drug Dev. Ind. Pharm. 13, 1495-1509 (1987).
- Johansson, B., Nicklasson, F., Alderborn, G.: Pharm. Res. 12, 164 (1995).
- Johansson, B., Wikberg, M., Alderborn, G.: Int. J. Pharm. 117, 57-73 (1995).
- Milli, G. P., Schwartz, J. B.: Drug Dev. Ind. Pharm. 16, 1411-1426 (1990).
- Beckert, T., Lehmann, T. K., Schmidt, P. E.: Int. J. Pharm. 143, 13-23 (1996).
- Dashevsky, A., Kolter, K., Bodmeier, R.: Int J Pharm 279, 19-26 (2004).
- Chang, R. K., Rudnic, E. M.: Int. J. Pharm. 70, 261-270 (1991).
- Bodmeier, R., Paeratakul, O.: Pharm. Res. 11, 882-888 (1994).
- Lehmann, K., Petereit, H. U., Dreher, D.: Drugs Made. Germ. 37, 53-60 (1994).

21. *Flament, M. P., Leterme, P., Gayot, A., Gendrot, E., Bruna, E., Cousin, G.*: Pharm. Technol. Eur. 2, 19-25 (1994).
22. *Altaf, S. A., Hohag, S. W., Ayres J. W.*: Drug Dev. Ind. Pharm. 24, 737-746 (1998).
23. *Altaf, S. A., Hohag, S. W., Ayres J. W.*: Drug Dev. Ind. Pharm. 25, 635-642 (1999).
24. *Pinto, J. F., Podczek, F., Newton, J. M.*: Int. J. Pharm. 147, 79-93 (1997).
25. *Pinto, J. F., Podczek, F., Newton, J. M.*: Int. J. Pharm. 152, 7-16 (1997).
26. *Lundquist, A. E. K., Podczek, F., Newton, J. M.*: Int. J. Pharm. 147, 95-107 (1997).
27. *Flament, M. P., Leterme, P., Gayot, A., Gendrot, E., Bruna, E., Cousin, G.*: Pharm. Technol. Eur. 2, 19-25 (1994).
28. *Wagner, K. G., Krumme, M., Schmidt, P. C.*: Eur. J. Pharm. Biopharm. 47, 79-85 (1999).
29. *Haubitz, H., Mehnert, W., Frömming, K. H.*: Pharm. Ind. 58, 19-25 (1996).
30. *Wagner, K. G., Krumme, M., Schmidt, P. C.*: J. Pharm. Sci. 10, 327-334 (2000).

Érkezett: 2013. december 9.

---



## Kohonen-féle önszerveződő tulajdonságtérkép használata humán ADMET és kináz adatok QSAR predikciójában

HEGYMEGI-BARAKONYI BÁLINT<sup>a,b</sup>, ÓRFI LÁSZLÓ<sup>a,b,c</sup>, KÉRI GYÖRGY<sup>a,b,d</sup>  
ÉS KÖVESDI ISTVÁN<sup>b,e</sup>

<sup>a</sup> Racionális Hatóanyagtervező Laboratóriumok Kooperációs Kutatóközpont, Semmelweis Egyetem, Üllői út 26. 1085 Budapest

<sup>b</sup> Vichem Chemie Kutató Kft., Herman Ottó utca 15. 1022 Budapest

<sup>c</sup> Gyógyszerészeti Kémiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Hőgyes Endre utca 9. 1092 Budapest

<sup>d</sup> MTA Pathobiokémiai Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Tűzoltó utca 37-47. 1094 Budapest

<sup>e</sup> RK Tech Kft., Kőszál utca 6. 1163 Budapest

\*Levelezési cím: hbbalint@vichem.hu

### Summary

Hegymegi-Barakonyi B., Órfi L., Kéri G. and Kövesdi I.: *Application of Kohonen Self Organized Feature Maps in QSAR of human ADMET and kinase data sets*

QSAR predictions have been proven very useful in a large number of studies for drug design, such as kinase inhibitor design as targets for cancer therapy, however the overall predictability often remains unsatisfactory. To improve predictability of ADMET features and kinase inhibitory data, we present a new method using Kohonen's Self-Organizing Feature Map (SOFM) to cluster molecules based on explanatory variables (X) and separate dissimilar ones. We calculated SOFM clusters for a large number of molecules with human ADMET and kinase inhibitory data, and we showed that chemically similar molecules were in the same SOFM cluster, and within such clusters the QSAR models had significantly better predictability. We used also target variables (Y, e.g. ADMET) jointly with X variables to create a novel type of clustering. With our method, cells of loosely coupled XY data could be identified and separated into different model building sets.

**Keywords:** QSAR, ADME, ADMET, Kohonen, SOFM

### Összefoglaló

A QSAR modellekről már számos tanulmány bizonyította, hogy nagyon hasznos a gyógyszertervezésben, például a kináz gátlók rákterápiás célú tervezésében, azonban a becslő képesség gyakran továbbra sem kielégítő. Az ADMET és a kináz gátlási tulajdonságok becslésének javítása érdekében bemutatunk egy, a molekula leírók (X) alapján klaszterező Kohonen-féle önszerveződő tulajdonságtérképet (Self-Organizing Feature Map; SOFM) alkalmazó új módszert. Nagyszámú humán ADMET tulajdonságra és kináz gátlásra vizsgált vegyület esetében készítettünk SOFM klasztereket, majd megmutattuk, hogy a kémiaiilag hasonló molekulák kerülnek azonos SOFM klaszterbe és klasztereken belül a QSAR modelleknek szignifikánsan jobb a becslőképessége. Az X értékek mellett a cél tulajdonságokat (Y, például ADMET tulajdonságok) is felhasználtuk egy új típusú csoportosításra. A módszerünkkel lazán összekapcsolódó cellákba rendeződnek az XY adatok, amik különböző modellkészítő halmazként használhatóak.

**Kulcsszavak:** QSAR, ADME, ADMET, Kohonen, SOFM

### Bevezetés

A protein kinázok kulcsszerepet játszanak a tumoros és gyulladásos megbetegedések, az arteriosclerosis, az arthritis, bizonyos neurodegeneratív és fertőző betegségek patomechanizmusában. A hibás ill. „hamis” kináz jelek gátlása a modern gyógyszerkutatás egyik legfontosabb iránya. 2005-ben négy kismolekulás kináz inhibitor volt klinikai használatban [1], ez 2007-re további hárommal bővült [2], míg 2012-ben 26-ra növekedett [3]. Ez tisztán mutatja a protein kinázok növekvő fontosságát a gyógyszerkutatás terén.

A fejlesztés alatt álló gyógyszerhatóanyagok

elérhetősége, eloszlása, lebomlása, kiválasztása és toxicitása (Absorption, Distribution, Metabolism, Extraction and Toxicity; ADMET) értékes információt hordoz már a gyógyszerkutatás korai fázisában is, de sajnos kevés mért adat érhető el, mert nem vizsgálhatók nagy átbocsátó képességű (HTS) rendszerekben. Általában hosszú és gondos kísérletek során vizsgálják meg az ADMET paramétereiket a preklinikai és a klinikai vizsgálatok során. A kémiai diverzitása ezeknek az adatbázisoknak meglehetősen nagy, ráadásul az emberi populációk inhomogenitása miatt ezeknek a biológiai tulajdonságoknak a szórása is jelentős. Mindezek következtében az ADMET tulajdonságok QSAR mo-

dellel való megbízható becslése nagy kihívást jelent. Nagy előnyt jelentene a korai gyógyszerfejlesztésben – a találatkereséstől a vezetőmolekula optimalizálásig – egy megbízhatóbb ADMET paraméterbecslés, amelyre mi egy új, önszerveződő tulajdonság térképet (*Self-Organizing Feature Map*; SOFM) használó modellt fejlesztettünk, ami némileg javította a QSAR modellek megbízhatóságát.

Az önszerveződő tulajdonság térképet (SOFM) *Teuvo Kohonen* találta ki a 80-as évek elején [4]. A módszer a mesterséges idegrendszeri hálózatok (*Artificial Neural Networks*; ANN) közé tartozó klaszterező eljárás, amely rendelkezik azzal a tulajdonsággal, hogy könnyen értelmezhetően mutatja a klaszterezés eredményét [5]. A Kohonen-féle SOFM nemcsak egy vizualizációs technika, hanem egy intelligens információ-tömörítő eszköz is. Általánosságban elmondható a módszerről, hogy robosztusabb és pontosabb nagyszámú zajos adat esetén, mint a hierarchikus klaszterező eljárások.

Különböző ADMET és egy kináz inhibitor adat-sort alkalmaztunk a modellezésre. Egyrészt humán vékonybél felszívódási adatokat (*Human Intestinal Absorption*; HIA) használtunk. Ez az érték a szájon át adagolt hatóanyagok több tulajdonságából adódik össze: oldhatóság és stabilitás az emésztőrendszerben, felszívódás a vékonybél falán keresztül és a májban történő first-pass metabolizmus. A 602 százalékos felszívódási adatot a szakirodalomból vettük [6]. A HIA predikciója nagyon hasznos az orális adminisztrációjú gyógyszerek fejlesztése során. Másrészt vér-agy gát (*Blood-Brain Barrier*; BBB) megoszlási adatokat használtunk. A BBB választja el a központi idegrendszert a véráramtól, a penetráció különösen a központi idegrendszerre ható gyógyszereknél fontos. 140 humán logBBB adatot a szakirodalomból vettük [7]. Harmadrészt egy ioncsatorna, a human Ether-à-go-go-Related Gene (hERG) termékének gátlási adatain alkalmaztuk az eljárásunkat. A fehérje bizonyos szívritmus-szabályozó gyógyszerek terápiás célpontja, de egészséges személyeken hosszú QT szindrómához vezet, ami halálos szívritmus zavarra hajlamosít [8, 9]. 119 összehasonlítható körülmények között mért hERG aktivitás adatból készítettünk modellt. Legvégül epidermális növekedési faktor-receptor (*Epidermal Growth Factor Receptor*; EGFR) kináz gátlási adatokat használtunk. Az EGFR-t azonosították mint a sejtek növekedéséért és osztódásáért felelős jelátviteli folyamatok egyik kiindulópontját, aminek a túlműködése tehető felelőssé számos szolid tumor típus kialakulásáért [10]. A vizsgálatokban kutató-

csoportunk korábban közölt adatait használtuk [11].

Megmutatjuk, hogy a (X) szerinti klaszterezés után a cél tulajdonságok (Y) klaszterenkénti vizsgálatával meghatározhatóak a „bizonytalan” területek, ahol a molekula leírók nem használhatóak a cél tulajdonságok pontos predikciójára. Ezeknek a „bizonytalan” területeknek a kihagyásával elkészülő modell prediktivitása szignifikánsan jobb, mint a teljes adathalmazból készülő.

## Kísérleti rész

### SOFM klaszterezés

Az SOFM neuronok kétdimenziós tömbje. Egy neuron egy koordináta-vektor, amelynek a dimenziója megegyezik a molekula leírók számával. A neuronok kapcsolódnak a környező neuronokhoz, a kapcsolódás mértéke a távolság növekedtével csökken. Ebben a munkában a 3DNET4W [11, 12] szoftvert használtuk az SOFM előállításához. Toroid topológiájú négyzetes SOFM-et használtunk, aminek köszönhetően a mátrix minden elemének ugyanannyi szomszédja van. A tanulási folyamatban egy adott klaszterezendő vegyület molekula leírójához kiválasztjuk az euklideszi távolságmetrika szerinti legközelebbi SOFM neuront (*Best-Matching Unit*; BMU). Úgy tanítjuk a BMU-t és a topológiai környezetét, hogy a BMU koordináta-vektorát megváltoztatjuk, hogy közeledjen a klaszterezendő vegyület molekula leírójához, majd a topológiai környezetet is megváltoztatjuk, hogy szintén közeledjen, de a BMU koordináta-vektoránál kisebb, a BMU-tól mért távolság növekedtével csökkentett mértékben. Így hatnak kölcsön a tanulás alatt a neuronok. Tanulási periódusnak nevezzük, ha ezt az eljárást elvégezzük az összes klaszterezendő vegyületre. A tanulási folyamat periódusok sorozata, mely során folyamatosan csökkentjük a BMU koordináta-vektorának változásához képest a topológiai környezet változását. Erre a 3DNET4W egy Gaussian-szerű szomszédságfaktor használ. A szomszédságfaktor (*neighbourhood kernel*; K) j és k neuron között az 1. egyenlettel számolható ki, ahol  $d_{jk}$  jelenti j és k neuron távolságának és a Kohonen-térkép élhosszúságának hányadosát és r pedig egy, periódusonként folyamatosan csökkentett együthartható (1. egyenlet).

$$K_{jk} = e^{-\frac{d_{jk}}{r_i}} \quad (1)$$

A periódusok számát 1000-nek határoztuk meg,  $r$  értékét 0,05-től 0,001-ig lineárisan csökkentettük és egy perióduson belül a klaszterezendő vegyületeket véletlenszerű sorrendben használtuk a tanításra. Itt meg kell jegyeznünk, hogy a tanítás alatt az  $Y$  értékek nem kerültek felhasználásra.

Amint az SOFM elkészül, a szoftver a tulajdonságtérkép minden neuronjára megjeleníti a hozzá tartozó vegyülethalmozás cél tulajdonságainak ( $Y$ ) átlagát, szórását, az  $U$ -mátrixot (*Unified distance matrix* vagy Ultsch-mátrix;  $U$  [13]) és az általunk  $XY$  bizonytalanságnak nevezett értéket (*fuzziness*;  $F$ ). Az  $U$ -mátrix mérete megegyezik az SOFM méretével és az értéke úgy számolható ki, hogy minden neuron koordináta-vektorának nyolc közvetlen szomszédja koordináta-vektorától elemenként mért eltérését összegezzük, majd az így kapott vektor elemeit is összesítjük. Az  $U$ -mátrix magas értéke a szomszédos koordináta-vektorok közti nagyobb eltérést jelzi, ami az SOFM-en értelmezhető régiók határán alakul ki. Az  $F$  ( $XY$  bizonytalanság) értékét pedig a 2. *egyenlettel* számítjuk ki.  $\sigma_Y$  az  $Y$  értékek szórása,  $\chi^2$  pedig a koordináta-vektor átlagos távolsága a klaszterbe tartozó  $X$  értékektől.

$$F = \frac{\sigma_Y}{\chi^2} \quad (2)$$

Ha egy SOFM elem nagyon hasonló molekula leírójú vegyületeket gyűjt, amikhez nagyon eltérő  $Y$  értékek párosulnak az  $F$  értéke magas lesz. Az ilyen klaszterekben levő bizonytalan adatok fogják lerontani a QSAR modellünk predikciós képességét. Másképpen fogalmazva, nagyon hasonló molekula leírójú vegyületekre kellene nagyon eltérő  $Y$  értékeket becsülni, de a QSAR modellünk csak egy értéket fog visszaadni, ami nagyon eltérhet a valóságtól. A 3DNET4W automatikusan eltávolítja ezeket a bizonytalan adathalmazokat. Ez az eljárás teljesen modell független, azaz nem vesz figyelembe semmilyen QSAR számítást, kizárólag az SOFM-re támaszkodik. Ebben a munkában ennek az eljárásnak a hatását vizsgáljuk néhány tipikusan zajos biológiai adathalmazon.

Az alkalmazott molekula leírók kiválasztása kiemelkedő jelentőségű minden molekula modellezési folyamatban. Az SOFM létrehozása előtt két módszer segítségével szűkítettük le a nagyszámú számított leírókat a munkánkhoz megfelelő halmazra. Az első az információ-tartalom szerinti kiválasztás. A vizsgálat egy adott molekula leíró, az összes molekulára számított értékének az eloszlásán alapul. Az információ-tartalom magas, ha a le-

író értékek eloszlása egyenletes, illetve nulla, ha a leíró értéke állandó. A második módszerben kettő vagy három rejtett neuront tartalmazó feed-forward topológiájú ANN-t tanítottunk back-propagation algoritmussal az  $Y$  értékek becslésére a molekula leírókból. Ilyen kevés neuronnal csak az ANN általánosító képességét használtuk ki. Az igazán fontos leírókat a tanítás után a bemeneti réteg és a rejtett réteg közti súlyok nagyságából határoztuk meg [14, 15].

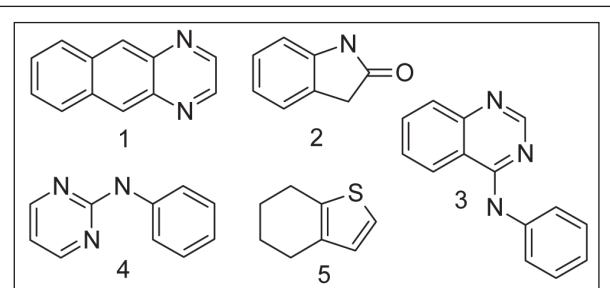
## Eredmények

### Vegyületcsaládok klaszterezése

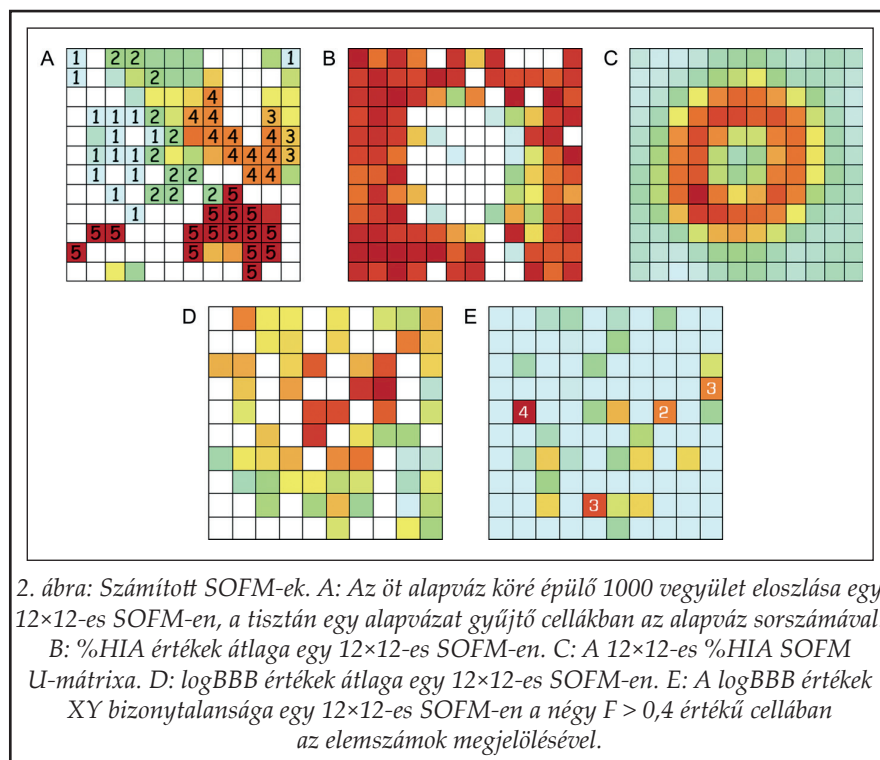
Öt, a szakirodalomban leírt kináz gátló vegyületekben megtalálható kémiai alapvázát választottunk ki, melyekhez 200-200 vegyületet kerestünk a Vichem Kft. kémiai vegyülettárából (1. *ábra*). 1: benzo[g]kinoxalinok [16], 2: oxindolok [17], 3: 4-fenilamino-kinazolinok [11], 4: 2-fenilamino-pirimidinek [11], 5: 4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofének [18]. A számításokhoz 151 topológiai molekula leírókat számoltunk ki minden vegyülethez, amelyek közül 12 darabot választottunk ki. 12×12 méretű SOFM-mel klaszterezve az 1000 vegyületet az adott cellába kerülő vegyületek alapváz-sorszámanak átlagait ábrázolva megállapítottuk, hogy a vegyületek több mint 90%-a olyan cellába került, amelybe csak azonos alapvázú vegyületek kerültek (2A *ábra*). Ez jól mutatja, hogy néhány absztrakt számított leíró nagyon hatékonyan képes a vegyületeket hasonlóság alapján rendezni.

### %HIA

A 602 %HIA adattal rendelkező vegyületünkhöz kiválasztottunk 62 molekula leírókat, amelyek segítségével elvégeztük a klaszterezést egy 12×12 SOFM-en. A Kohonen térképen ábrázolva az egy cellában levő vegyületek %HIA értékének átlagát azt láthatjuk, hogy az SOFM összegyűjtötte az



1. ábra: Öt ismert kináz inhibitor vegyületcsalád alapváza



alacsony Y értékű vegyületeket középre, míg a magas Y értékűek az SOFM peremére kerültek (2B ábra). Az eredmény jobb megértésének érdekében kiszámoltuk az U-mátrixot is (2C ábra), ami az alacsony és a magas %HIA értékű cellák határán mutat maximumot, elválasztva azokat egymástól. Ez a klaszterezés egy egyszerűen használható figyelmeztető eszköz, miszerint: ha a vegyület az SOFM ~8 cella átmérőjű közepébe klasztereződik, gondjai lehetnek a %HIA paraméterével.

### BBB

Részleges legkisebb négyzetek módszerrel (Partial Least Squares; PLS) készítettünk QSAR modellt a 3DNET4W szoftver segítségével. A molekula leíró kiválasztására genetikus algoritmust használtunk.

szítunk modellt, jobb modellt kapunk mint az eredeti (I. táblázat).

### hERG

A 3DNET4W-val már készítettünk korábban egy hERG aktivitás QSAR modellt. Ez a modell a szakirodalomból gondosan kiválasztott 119 vegyület összehasonlítható körülmények között mért adatainak felhasználásával készült. Véletlenszerű kiválasztással 19 vegyület került a külső ellenőrző halmazba. SOFM-et készítettünk annak a 16 leírónak a segítségével, amelyeket a fenti hERG aktivitás ANN modell elkészítéséhez kiválasztottunk. Az  $F > 1,25$  értékű három legbizonytalanabb cellát kizárva 92 vegyületünk maradt a modellkészítésre. Az eredeti 16 leíróból kiindulva a 3DNET4W készített egy új modellt, amelynek már csak 13 le-

I. táblázat

logBBB eredmények			
logBBB	Tréning halmaz	Külső validációs halmaz	$Q^2$
Régi modell 19 leíró 10 PLS komponens	120 vegyület eredeti tréning halmaz	20 vegyület	0,466
Új modell 12 leíró 9 PLS komponens	108 vegyület „bizonytalanmentes” tréning halmaz	20 vegyület	0,704
Új modell 12 leíró 9 PLS komponens	120 vegyület eredeti tréning halmaz	20 vegyület	0,647



II. táblázat

## %hERG eredmények

hERG	Tréning halmaz	Külső validációs halmaz	Q <sup>2</sup>
Régi modell 16 leíró 2 rejtett neuron	100 vegyület eredeti tréning halmaz	19 vegyület	0,374
Új modell 13 leíró 2 rejtett neuron	92 vegyület „bizonytalanmentes” tréning halmaz	19 vegyület	0,417
Új modell 13 leíró 2 rejtett neuron	100 vegyület eredeti tréning halmaz	19 vegyület	0,372

írója és két rejtett neuronja lett. A külső ellenőrzés adatai a **II. táblázatban** találhatóak.

## EGFR

A csoportunk korábbi publikációjában bemutatott modellekre alkalmaztuk az SOFM-et [11]. A leköztöltött legjobb PLS modell tanuló halmazának bizonytalan elemeit szűrtük ki ( $F > 0,8$ ). Az eredeti tanulóhalmaz 7%-ának eltávolítása után ugyanazokat a leírókat és ugyanannyi PLS paramétert használva mint az eredeti modell egy újratanítás némileg jobb Q<sup>2</sup> értéket eredményezett mint az eredeti (**III. táblázat**).

## Az eredmények értékelése

Megállapíthatjuk, hogy az SOFM-ek használata nem problémamentes, hiszen nem determinisztikus és egyáltalán nem garantált a konvergenciája sem. Mindkét dolog a koordináta-vektorok véletlenszerű kezdeti paramétereitől függ, de ha egyszer az SOFM konvergált, hasznos eszközzé válik az adatelemzésben. A 3DNET4W kiszámolja az összes  $\chi^2$  érték összegét. Ha ez az érték túl nagy vagy az SOFM nem vizuálisan megfelelő eloszlást mutat, könnyen el lehet indítani egy új kalkulációt. A tapasztalatunk szerint ez a két dolog együtt jár.

## Következtetések

Bemutattunk egy modellfüggetlen kiugró adat ke-

reső eljárást, ami lineáris és nemlineáris QSAR adathalmazokra egyaránt alkalmazható. Azonosítottuk a Kohonen-féle SOFM-ek bizonytalan területeit, ahol kiugróak az adatpontok vagy másként fogalmazva gyengén korrelálnak a molekula leírók (X) és a cél tulajdonságok (Y). A természetük-nél fogva zajos biológiai tulajdonságok e kiugró részek eltávolítása után általában egységesebb állapotba kerülnek, ami egyszerűsíti a QSAR modelleket vagy csak növeli egy újratanított modell predikciós erejét.

Az SOFM-ek bizonytalan területeire két magyarázattal is tudunk szolgálni. Tegyük fel, talán kissé naivan, hogy a kiszámított molekula leírók mind helyesek. Az egyik magyarázat az lehet, hogy a mért biológiai cél tulajdonságoknak nagyobb a hibája a bizonytalan területeken mint egyébként; a másik, hogy a molekula leírók nem képesek leírni a cél tulajdonságokat pontosan azokban a cellákban. Az első esetet véve, ha úgy véljük, hogy a leíróink megfelelőek, akkor a nagy XY bizonytalan-ságú valószínűleg hibás adatok eltávolítása nem tud túl nagy kárt okozni. Másrészt, ha azt állapítjuk meg, hogy a molekula leírók nem megfelelőek az adathalmazunk leírására, nem szabad folytatnunk a QSAR modellezést, amíg nem találunk alkalmas leírókat.

A nagy és kémiai diverz adatsorok számára kifejlesztett QSAR modellek általában jelentős számú leírót tartalmaznak, hogy meg tudjanak birkózni a kémiai sokféleséggel. Egy adott molekula leíró csoport, amelyet megfelelően leírja vagy

III. táblázat

## EGFR eredmények

EGFR	Tréning halmaz	Külső validációs halmaz	Q <sup>2</sup>
Régi modell 53 leíró 46 PLS komponens	416 vegyület eredeti tréning halmaz	207 vegyület	0,608
Régi modell 53 leíró 46 PLS komponens	387 vegyület „bizonytalanmentes” tréning halmaz	207 vegyület	0,613

becsli egy vegyületcsalád cél tulajdonságait, nem feltétlenül optimális egy másik család leírására is. Egy univerzális QSAR modell túlterhelődik leírókkal, amelyek jelentős része csak zajként fog szolgálni az adathalmaz jónéhány molekulája esetén. Már túlmutat a jelen tanulmány célján, hogy megvizsgáljuk, hogyan kell Ockham borotváját használni, hogy automatikusan elkülönítsük azokat a területeket az SOFM-en, ahol csökkentett számú molekula leíróval egy-egy egyedi QSAR modellt használva összességében jobban teljesítő modelleket tudunk létrehozni, mint az egész adathalmaz egy nagy univerzális modellje. A 3DNET4W egy új verziója képes lehet erre, az előzetes eredményeink biztatóak.

### Köszönetnyilvánítások

Köszönjük Dr. Szénási Gábornak, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a hERG adatokat. A munka az MM4TB pályázatnak a támogatásával készült.

### IRODALOM

1. Keri, G., Szekelyhidi, Z., Banhegyi, P., Varga, Z., Hegymegi-Barakonyi, B., Szantai-Kis, C., Hafenbradl, D., Klebl, B., Muller, G., Ullrich, A., Eros, D., Horvath, Z., Greff, Z., Marosfalvi, J., Pato, J., Szabadkai, I., Szilagyi, I., Szegedi, Z., Varga, I., Waczek, F., Orfi, L.: *Assay Drug. Dev. Technol.* 3, 543-551 (2005).
2. Kwak, E.L., Clark, J.W., Chabner, B.: *Clin. Cancer Res.* 13, 5232-5237 (2007).
3. Cohen, P., Alessi, D.R.: *ACS Chem Biol.* 8, 96-104 (2013).
4. Kohonen, T.: *Biol. Cybern.* 43, 56-69 (1982).
5. Kohonen, T.: *Self-organization and associative memory*, 3rd Edition. SpringerVerlag, Berlin, FRG, 1989.
6. Hou, T., Wang, J., Zhang, W., Xu, X.: *J. Chem. Inf. Model.* 47, 460-463 (2007).
7. Katriczky, A.R., Kuanar, M., Slavov, S., Dobchev, D.A., Fara, D.C., Karelson, M., Acree, W.E., Solov'ev, V.P., Varnek A.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 4888-4917 (2006).
8. Du, L., Li, M., You, Q., Xia, L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 889-894 (2007).
9. De Ponti, F.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56, 1-18 (2000).
10. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, N., Waterfield, M.D., Seeburg, P.H.: *Nature* 309, 418-425 (1984).
11. Szantai-Kis, C., Kovesdi, I., Eros, D., Banhegyi, P., Ullrich, A., Keri, G., Orfi, L.: *Curr. Med. Chem.* 13, 277-287 (2006).
12. 3DNET4W, Ver. 1.78, CompElit Ltd., Budapest, 2008.
13. Ullsch, A.: *Self-Organizing Neural Networks for Visualisation and Classification*. In: Opitz, O., Lausen, B., Klar, R. (eds): *Studies in Classification, Data Analysis and Knowledge Organization*. Springer-Verlag, Berlin, 1990. pp. 307-313.
14. Masters, T.: *Practical Neural Network Recipes in C++*. Academic Press, Boston, 1996.
15. Kovesdi, I., Dominquez-Rodriguez, M.F., Orfi, L., Naray-Szabo, G., Varro, A., Papp, J.G., Matyus, P.: *Med. Res. Rev.* 19, 249-269 (1999).
16. PCT Int. Appl. WO2002094796 (2002).
17. García-Echeverría, C., Traxler, P., Evans D.B.: *Med. Res. Rev.* 20, 28-57 (2000).
18. PCT Int. Appl. WO2005023818 (2005).

Érkezett: 2013. november 15.

## **FELHÍVÁS**

### **ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA**

### **ELŐFIZETÉSRE**

Tájékoztatjuk kedves Kollégáinkat, hogy

- az Acta Pharmaceutica Hungarica c. folyóiratra 2013-ban előfizetéssel rendelkezők a 2014. évre vonatkozó számlát előreláthatólag január közepéig megkapják;
- az Acta Pharmaceutica Hungarica c. folyóirat 2014. évi előfizetési díja 6000 Ft + 5% áfa, egy példány ára: 1500 Ft + 5% áfa.

Kérjük, hogy az előfizetői adatokban történt változásokat juttassák el Polonyi Adrienn részére (tagdij@mgyt.hu; fax: 266-9433, 483-1465; levelezési cím: Magyar Gyógyszerész-tudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.)

**Új előfizetésekre is van lehetőség. Előfizetési igényeiket juttassák el Polonyi Adrienn részére (tagdij@mgyt.hu; fax: 266-9433, 483-1465; levelezési cím: Magyar Gyógyszerész-tudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.)**

